



الجمهورية العربية السورية

جامعة البعث

كلية الطب البيطري

قسم الأحياء الدقيقة

تحديد المستضدات الرئيسة للكيسات العدارية عند الأغنام العواس في سورية

أطروحة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في التحليل والتشخيص المخبري- طفيليات

أعدها الدكتور البيطري

عبد المنعم الياسين

ماجستير في التحليل والتشخيص المخبري (طفيليات)

إشراف

أ.د. محمد محسن قطرنجي ، أستاذ الطفيليات – جامعة البعث

أ.د. محمود قويدر، أستاذ المناعة – جامعة دمشق

بالتعاون العلمي مع

الأستاذة الدكتورة سعاد العقلة

أستاذة المناعة – جامعة دمشق

2011 م - 1432 هـ



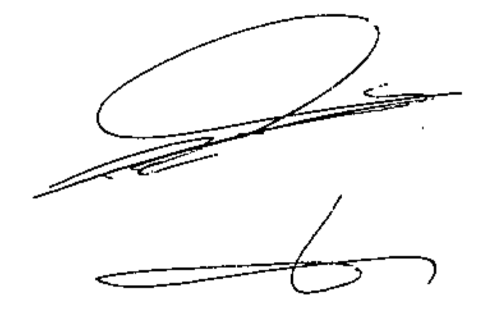
قرار لجنة الحكم والمناقشة

استناداً إلى قرار مجلس البحث العلمي والدراسات العليا بجامعة البعث رقم (796) المتخذ بالجلسة رقم (19) للعام الدراسي ٢٠١٠ – ٢٠١١ المنعقدة بتاريخ ٢٢ رجب ١٤٣٢هـ الموافق 23/6/٢٠١١م القاضي بتشكيل لجنة الحكم والمناقشة لرسالة الدكتوراه للطالب عبد المنعم الياسين بعنوان :

" تحديد المستضدات الرئيسة للكيسات العدارية عند الأغنام العواس في سورية "

وبعد عرض الرسالة وسردها ومناقشتها، اجتمعت لجنة الحكم والمناقشة بتاريخ ٢٠١١/٩/٢١ وبعد المداولة قررت اللجنة ترشيح طالب الدراسات العليا عبد المنعم الياسين لنيل درجة الدكتوراه في العلوم الطبية البيطرية – اختصاص (طفيليات) بتقدير عام (امتياز) وبدرجة (٩٤،٨).

وتوصي اللجنة بصرف تكاليف طباعة الأطروحة على نفقة الجامعة نظراً للجهد الذي بذله الطالب والتكاليف التي تكبدها إضافة إلى تناوله موضوعاً حساساً من الناحية الاقتصادية في القطر.

أعضاء اللجنة	**التوقيع**
أ. د. عبد الرزاق المقداد اختصاص الطفيليات كليّة الطب البيطري – جامعة البعث	
أ. د. عبد الكريم الخالد **اختصاص طفيليات وأمراض طفيلية** كلية الطب البيطري – جامعة البعث	
أ. د. محمد محسن قطرنجي اختصاص الطفيليات كلية الطب البيطري – جامعة البعث	
أ. د. حسن سلمان اختصاص علم المناعة كلية العلوم – جامعة تشرين	
أ. د. محمد معروف **اختصاص طفيليات وفطور** كلية الصيدلة– جامعة دمشق	

الأستاذ الدكتور عميد كلية الطب البيطري

بعد الإطلاع على الأطروحة المعدلة من رسالة الدكتوراه المقدمة من قبل المرشح لنيل درجة الدكتوراه في العلوم الطبية البيطرية طالب الدراسات العليا عبد المنعم الياسين في قسم أمراض الأحياء الدقيقة – اختصاص (طفيليات) بعنوان :

" تحديد المستضدات الرئيسة للكيسات العدارية عند الأغنام العواس في سورية "

نفيدكم بأن الأطروحة بشكلها الحالي قد استوفت التعديلات التي أشارت لها لجنة الحكم والمناقشة التي عقدت يوم الأربعاء بتاريخ ٢١ / ٩ / ٢٠١١ لمناقشة الرسالة، ونعتبر أن الرسالة بهذه الصورة جاهزة للطباعة بشكلها النهائي.

يرجى الإطلاع

وتفضلوا بقبول فائق الاحترام والتقدير

عضو	عضو	عضو	عضو
أ. د. محمد معروف	أ. د. عبد الكريم الخالد	أ. د. حسن سلمان	أ. د. محمد محسن قطرنجي

رئيس اللجنة

أ. د. عبد الرزاق المقداد

رئيس قسم الأحياء الدقيقة

أ. د. محمد محسن قطرنجي

مصدق

عميد كلية الطب البيطري

أ. د. عزام كردي

شـــــهادة

أشهد بأن العمل الموصف في هذه الرسالة هو نتيجة بحث قام به (الطالب) الطبيب البيطري عبد المنعم الياسين تحت إشــراف الأســتاذ الدكتور محمد محسن قطرنجي و بمشاركة الدكتور محمود قويدر من كلية العلوم في جــامعة دمشق و أي رجوع إلى بحث آخر موثوق في النص.

المرشح	المشرف العلمي	المشرف المشارك
عبد المنعم الياسين	أ.د. محمد محسن قطرنجي	د. محمود قويدر

بالتعاون العلمي مع

الدكتورة سعاد العقلة

* Certificate *

It is hereby Certified that the work described in the present thesis is resulted of the author's own investigation under supervision of Prof. Mohsen Katranji and **prof. Mahmood Kowider** and scientific cooperation with **prof. Soaad Okla** at the Faculty of Veterinary Medicine, Al-baath university and any reference to other researchers work have been acknowledged in the text.

Candidate

Abdulmounem. Al-Yasin

Supervisors

Prof. M. Mohsen Katranji

prof. Mahmood Kowider

Cooperation with

Prof. Soaad Okla

Date 1/10/2011

((تصــريح))

أصرح بأن هذا البحث و الذي هو بعنوان :

((تحديد المستضدات الرئيسة للكيسات العدارية عند الأغنام العواس في سورية))

لم يسبق أن قبل للحصول على أي شهادة و لا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

1/10/2011

توقيع المرشح

عبد المنعم الياسين

DECLARATION

It is hereby declared that this work

Identification of the major hydatid cystic antigens in Awassi sheep in Syria

has not been accepted already for any degree, nor is being submitted concurrently for any other degree.

Candidate

Abdulmounem Al-yasin

Date

1/10/2011

فهرس المحتويات

العنوان	رقم الصفحة
الدراسة المرجعية	1
مقدمة	2
الأهداف	51
المواد والطرائق	52
النتائج	92
المناقشة	118
الاستنتاجات	132
التوصيات	133
الملخص باللغة العربية	134
الملخص باللغة الانكليزي	136
المراجع	138

فهرس الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1	الذراري/ الأنماط الجينية لأنواع المشوكة الحبيبية الحبيبية.	12
2	برنامج تمنيع الأرانب والحصول على الأمصال وحيدة النوعية.	89
3	العصائب المشتركة بين بروتينات الديدان المدروسة المفصولة في هلامة عديد الأكريلاميد.	101
4	العصائب غير المشتركة بين بروتينات الديدان المدروسة المفصولة في هلامة عديد الأكريلاميد.	102
5	العصابات المشتركة وغير المشتركة بين بروتينات السائل العداري الرئوي في الإصابتين المفردة والمزدوجة.	103
6	العصابات المشتركة وغير المشتركة بين بروتينات رؤيسات الكيسات العدارية الرئوية في الإصابتين المفردة والمزدوجة.	104
7	العصابات المشتركة وغير المشتركة بين بروتينات الرؤيسات الأولية للكيسات العدارية الكبدية والرئوية في الإصابة المزدوجة.	105
8	نتائج التفاعلات التصالبيّة بين الأمصال وحيدة النوعية لوحدات السائل العُداري ومستَضدات الديدان المدروسة.	107
9	قراءات الكثافة الضوئية بتقنية الاليزا غير المباشرة بطريقة رقعة الشطرنج لتحديد التركيز المثالي للمستضد.	115
10	تحديد الحساسية والنوعية لاختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة.	117

فهرس الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1	أنواع المشوّكات الأربعة.	3
2	المشوكة الحبيبية.	4
3	بنية الكيسة العداريّة والمحافظ النسليّة والرؤيسات الأوليّة. مقطع في كيس عداري للمشوكة الحبيبيّة .	6
4	دورة الحياة للمشوكة الحبيبية وطرق الخمج.	7
5	تناول كلاب الراعي لحيوانات نافقة مصابة بداء الكيسات العُدَاريّة.	9
6	التعديل المناعي الناجم عن المشوكة الحبيبية.	24
7	توسع في البطن عند طفل نتيجة الإصابة بداء المشوكات الكيسية في الكبد.	34
8	تشخيص الكيسات العدارية الرئوية للمشوكات الحبيبية باستعمال التصوير الشعاعي.	34
9	كبد أغنام مصاب بالكيسات العدارية.	54
10	سائل عداري وفي القاع راسب من الرؤيسات الأولية.	56
11	الطور اليرقي للشريطية هيداتجينا (الكيسة مذنبة دقيقة الرقبة).	58
12	ديلزة المعلق البروتيني المرسب بسلفات الأمونيوم للعينات المدروسة.	60
13	عمود الكروماتوغرافيا مرزوم بالسيفادكس G-100.	62
14	تحميل عينة البروتين في قاع حفر هلامة أكريلاميد التكثيف.	69
15	فصل البروتينات في هلامة عديد الأكريلاميد بوساطة جهاز الرحلان الكهربائي	70
16	مخطط يبين مراحل إظهار البروتينات بعد نقلها إلى الغشاء.	71
17	مرحلة حضن شرائط النتروسيللوز في دارئة TBST-NFM 3% على الهزاز الأفقي.	75
18	مرحلة غسل شرائط النتروسيللوز في الدارئة على الهزاز.	76
19	معايرة الأضداد الأولية بالمقياسة المناعية المقترنة بالإنظيم المباشرة	80
20	معاير المستضد بالمقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة.	83
21	تطور اللون وحدوث التفاعل بطريقة رقعة الشطرنج لتحديد التمديد المثالي لتفاعل الأضداد الثانوية والمستضد.	84

22	تبطين الحفر بالمستضد في أطباق الاليزا وامتزاز المستضد.	85
23	قراءة الكثافة الضوئية في قارئ الاليزا.	86
24	رعاية أرانب التجربة في أقفاص خاصة وتنفيذ الحجر الصحي.	87
25	حقن الأرانب بمعلق المستضد تحت الجلد في منطقة الأكتاف في مواقع متعددة للعصائب المعزولة.	88
26	جمع الدم من القلب مباشرة من أرانب التجربة.	89
27	استفراد بروتينات السائل العُداري الكبدي في عمود السيفادكسG-100	93
28	استفراد بروتينات السائل العداري الرئوي في عمود السيفادكس G-100.	94
29	استفراد بروتينات السائل العداري الرئوي للعينة المفردة الكاملة في عمود السيفادكس G-100.	94
30	استفراد بروتينات الشريطية المونيزية اكسبانزا في عمود السيفادكس G-100.	95
31	استفراد بروتينات الشريطية تيسانيزية في عمود السيفادكس G-100.	95
32	استفراد بروتينات المتورقة الكبديّة في عمود السيفادكسG-100 .	96
33	استفراد بروتينات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة في عمود السيفادكس G-100.	96
34	فصل بروتينات السائل العُداري الكبدي المزدوج في هلامة عديد الأكريلاميد، تركيز 12%، صبغة أزرق كومازي R250.	97
35	فصل بزوتينات السائل العُداري الرئوي المزدوج في هلامة عديد الأكريلاميد	98
36	فصل بروتينات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة في هلامة عديد الأكريلاميد 12%، صبغة أزرق كومازي R250.	99
37	فصل بروتينات الشريطية التيسانيزية في هلامة عديد الأكريلاميد 12%، صبغة أزرق كومازي R250.	100
38	فصل بروتينات الشريطية المونيزية اكسبانزا و المتورقة الكبديّة في هلامة عديد الأكريلاميد تركيز 12%، صبغة أزرق كومازي R250 .	101
39	مقارنة بين فصل بروتينات الكيسة العُدَارِيّة المزدوجة والمفردة والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة في هلامة عديد الأكريلاميد تركيزها 12%، صبغة أزرق كومازيR250	103
40	فصل بروتينات الرؤيسات الأولية في هلامة عديد الأكريلاميد 12% ، صبغة كومازي.	105
41	اختبار التبصيم المناعي النقطي (Dot-blot) ، تفاعل الأمصال وحيدة النوعية	106

	لوحدات السائل العداري الكبدي 27، 38، 54 كيلودالتون مع المستضدات الخام للديدان المدروسة.	
42	التبصيم المناعي لمستضدات سائل الكيسات العُذارِيّة الكبديّة مع أمصال ايجابية للكيسات العُذارِيّة.	108
43	التبصيم المناعي لمستضدات السائل العُذاري الكبدي.	108
44	التبصيم المناعي لمستضدات سائل الكيسات العُذارية الرئوية مع الأمصال الايجابية للكيسات العُذارِيّة.	109
45	اختبار التبصيم المناعي لمستضدات الرؤيسات الأولية للكيسات العُذارِيّة مع الأمصال الايجابية.	110
46	تفاعل الأمصال وحيدة النوعية للعصابة54 كيلودالتون مع مستضدات الديدان الأخرى.	111
47	تفاعل الأمصال وحيدة النوعية للعصابة 38 كيلودالتون مع مستضدات الديدان المدروسة	112
48	تفاعل مع الأمصال وحيدة النوعية للعصابة 27 مع مستضدات الديدان المدروسة.	113
49	مخطط بياني لوغاريتمي لتحديد التمديدات المثالية لكل من المصل، والضد الثانوي المقترن بالإنظيم (Checkerboard).	114
50	مخطط بياني لتحيد التركيز المثالي للمستضد والتمديد المثالي للضد الثانوي بطريقة رقعة الشطرنج.	115
51	مخطط ROC البياني لتحديد القيمة الفاصلة بين العينات الايجابية والعينات السلبية(Cut- off).	116

1- الدراسة المرجعية

Review study

1-1- المقدمة:

يعد داء الكيسات العُدَارِيّة مرض طفيلي مزمن، مستوطن، واسع الانتشار خطير، يصيب الإنسان والحيوان، يسببه الطور اليرقي للشريطية المشوكة الحبيبية (*Echinococcus granulosus*) التي تنتمي لعائلة الشريطية، و تتطفل أنواعها في الأمعاء الدقيقة للعائلة الكلبية، وهو أحد أكثر الأمراض الطفيلية المشتركة انتشاراً في الإنسان (McManus و زملاؤه، 2003؛ Zhang و McManus، 2006؛ Craig و زملاؤه، 2007). ووفقاً للواسمات الجينية (Genetic markers)، صُنفت المشوكة الحبيبية إلى تسع ذراري (Meslin و Pawlowski، 2002). يُعد هذا الداء واسع الانتشار في العالم لاسيّما في البلدان المطلة على البحر الأبيض المتوسط، وهو يصيب طيف واسع من آكلات الأعشاب وخاصة الأغنام في مناطق تربيتها المكثفة. ويعد داء الكيسات العُدَارِيّة اليوم من الأمراض المهملة في العالم (Soulsby، 1987؛ Cabrera وزملاؤه، 2001؛ Eckert وزملاؤه، 2002؛ WHO، 2006). ويكون داء الكيسات العُدَارِيّة مرض بطيء وعادة يتطور المرض في الحيوان بدون أعراض مرضية، وغالباً ما تشخص الكيسات بعد النفوق (Hassan، 1991).

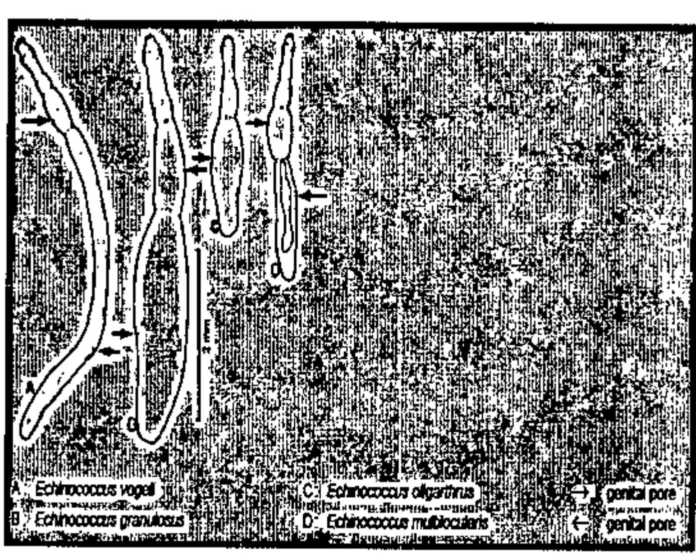
2-1- جنس المشوكة(*Genus Echinococcus*):

تعد المشوكات ديدان شريطيّة صغيرة، يتراوح طولها بين 2 و6 مم، تتألف من رؤيس يحمل أربعة محاجم دائريّة الشكل، وحيزوما مزوّداً بصفين من العقائف، وسلسلة تتكون من 3-6 قطع فقط، منها قطعة أو اثنتين ناميتين، وواحدة ناضجة وأخرى حاملة. وتحتوي القطع الناضجة على خصى تنتشرة أمام المبيض الذي يتوضع في الجزء الخلفي من القطع، وخلفه طابع البيض، والغدة المحيّة. بينما يقع المسم التناسلي أمام منتصف القطعة الناضجة أو خلفها، ويحتوي الرحم على بيوض بيضيّة الشكل، أو شبه كرويّة. وتصنف المشوكات شكليائياً في مراحلها اليرقيّة، وفي أطوارها الناضجة إلى أربعة أنواع (Oie، 2000) (الشكل1) وهي:

1-2-1- المشوكة أوليغارثروس (E. oligarthrus):

يتراوح طول الديدان الناضجة بين 1.9 و 2.9 مم، و تتألف من ثلاث قطع، وتكون القطعة ما بعد الأولى هي الناضجة، ويقع المسم التناسلي أمام الخط المتوسط في القطع الناضجة، وعلى الخط المتوسط تقريباً في القطع الحاملة، ويأخذ الرحم في القطع الحاملة الشكل الكيسي. وتتألف الكيسة العدارية من حويصلات متعدّدة مفصولة بأغشية، ومملوءة بالسائل العداري. ويصل قطر الحويصلة المفردة نحو 5 سم، وتتوضع في الأعضاء الداخليّة. و تشكّل

الحيوانات البرّيّة (أسد الجبال، القط البري الكبير، القط البري الصغير) الأثوياء النهائيّة، ويأخذ الأجووتي(Agouti) وهو من القوارض، دور الثوي المتوسط، كما يمكن أن تأخذ القوارض الأخرى هذا الدور، ولا يمكن أن يخمج الإنسان بهذا المرض (عدوي، 1998).



الشكل1. أنواع المشوّكات الأربعة (FAO، 1981)، يشير السهم الى موضع المسم التناسلي.

1-2-2- المشوكة فوجيلي (*E. vogeli*):

يتراوح طول الديدان الناضجة بين 3.9 و 5.6 مم، وتتألف من ثلاث قطع، ويقع المسم التناسلي خلف الخط المتوسط في القطعتين الناضجة والحاملة، وتتميّز بوجود رحم أنبوبي طويل نسبياً، أما الكيسة العدارية فتماثل نظيرتها في المشوكة أوليغارثروس. ويمثل الكلب البرّي والكلب المنزلي الثويّ النهائي، أما الثوي المتوسط فهو حيوان الباكا(Paca)، وهو من أنواع القوارض، وتتطور المرحلة اليرقيّة عند الإنسان مسببة داء الكيسات العداريّة بالشكل متعدّد الحويصلات، وهو أكثر الأشكال وجوداً في الكبد (حسين، 1997).

1-2-3- المشوكة متعدّدة المساكن (E. multilocularis):

يتراوح طولها بين 1.2-3.7 مم، و يتراوح عدد القطع بين 3 و5. ويقع المسم التناسلي أمام منتصف القطعة، أما الرحم فهو كيسيّ الشكل، وليس له جيوب جانبيّة. ويدعى الطور اليرقي بالمشوكة السنخيّة (E. alveolaris)، وتتصف بسرعة تشكّلها. وتتألف من العديد من الأجواف الصغيرة(سنخيّة الشكل)، التي تحتوي على سائل كيسي قليل وقد يختفي، ويصل قطر

الكيسة نحو 1 سم عند القوارض المخبريّة، بينما يزداد قطرها عند الإنسان، وتتوضع في الكبد بصورة رئيسيّة. وتقوم الكلاب والذئاب والثعالب والقطط بدور الأثوياء النهائيّة، بينما تقوم القوارض البرّيّة والفئران والإنسان بدور الأثوياء الوسيطة.ينتشر هذا النوع في أوروبا وسيبيريا وشماليّ الولايات المتحدة الأمريكيّة واليابان وإيران (عدوي، 1998)، وفي الدول المجاورة، لبنان وتركيا والعراق (Matossian، 1990).

1-2-4- المشوكة الحبيبيّة (*Echinococcus granulosus*):

يتراوح طول الدودة بين 3 و6 مم، وتتألف السلسلة الدوديّة من 3-4 قطع، وعادة ما تكـون واحدة أو اثنتين منها نامية (واحدة ناضجة، وأخرى حاملة). يبلغ طول القطعة الأخيرة حوالى نصف طول الدودة أو أكبر. يقع المسم التناسلي في منتصف القطع أو غلى الخلف قليلاً، ويظهر الرحم فـي القطع الحاملة على شكل أنبوبة بسيطة ذات جيوب جانبيّة (الشكل2).



الشكل2. المشوكة الحبيبيّة، يشير السهم إلى مكان المسم التناسلي (بارودي، 1990).

1-3- البنية الشكليائيّة للكيسات العداريّة (Hydatid cyst)

تتشكّل سليفة الشريطيّة(الكيسة العداريّة) في الثوي المتوسط، وتعدّ الطـور اليرقـي الخـامج للمشوكة الحبيبيّة عند اللواحم، ويتراوح قطرها بين عدة مليميترات و 20 سم، وأحيانا أكبر من

ذلك، خاصة في المواقع التي يكون فيها النمو حراً، مثل التجويف البطني(مجـــذوب، 2000).
وتتكون من غشائين يتشكّلان على حساب الطفيليّ، هما الغشاء الجليـــديّ (Cuticule layer) والغشاء المنتش (Germinative Layer)، وبنسيج ليفي ناجم عن التفاعلات المناعيّة النسيجيّة للثويّ يدعى بالغلالة البرانيّة (Adventice) أو بالمحفظة (Capsule)، غير أنها لا تتشكل في الكيسات العداريّة العظميّة(الجمجمة والعمود الفقري، وعظام الحـــوض) (Noble و Noble، 1974؛ Gentilin وزملاؤه، 1981).

1-3-1- الغشاء الجليديّ (Cuticule layer):

يشكّل هذا الغشاء الحاجز الخارجي للطفيلي، وهو غشاء أبيض صدفي شديد الثخانة وتتراوح ثخانته بين 1-2 مم، وهو عبارة عن طبقة خارجيّة غشائيّة، غير خلويّة، صفائحيّة غير منتشة. يحاط من الخارج بمحفظة ضامة يشكّلها الثويّ وتفصلها عن أنسجة الثويّ، وترتبط هذه المحفظة بالغشاء الجليديّ في الكيسات الحيّة (الشكل3)، وتنفصل عنه بفراغات ممتلئة بسائل في الكيسات الميتة. ولايوجد هذا الغشاء في الكيسات الفتيّة، التي تتراوح أعمارها مابين 14-18 يوماً، وذلك عند ظهورها الأول عندما تكون طريّة (Kilejian وزملاؤه، 1962 ؛ Craig وزملاؤه، 1995).

1-3-2- الغشاء المنتش (Germinal layer):

وهو طبقة رقيقة مؤلفة من الخلايا الجنينيّة الحبيبيّة المتعدّدة النوى، والغنيّة بالعناصر الخلويّة مع مختزنات غليكوجينيّة، وهو غشاء قليل الثخانة، تتراوح ثخانتـــة مـــابين 10-25 ميكـــرون، شـــديد البياض، وليّن جداً، وهشاً ويتفتت بسهولة في أثناء إزالته، وينتج عنه التشكيلات الآتية:

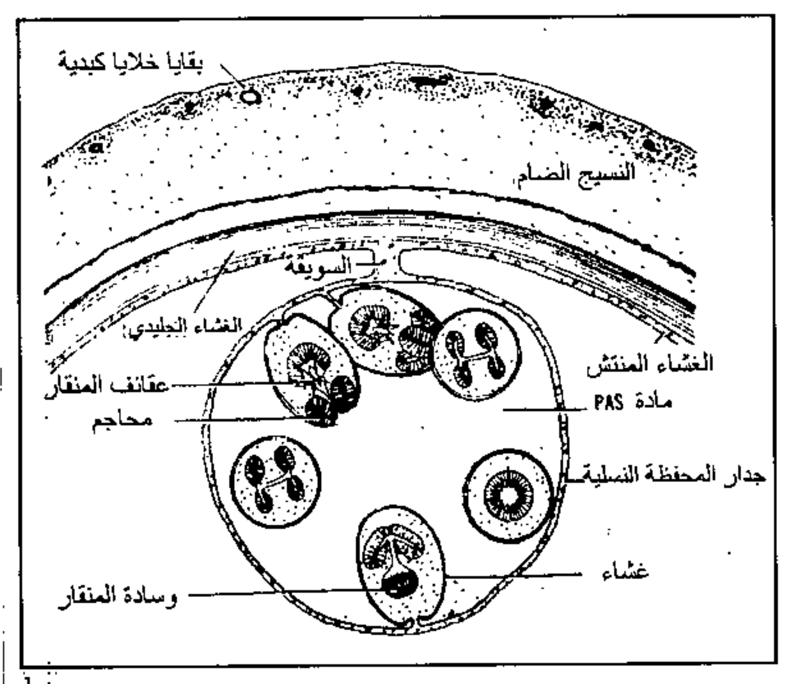
أ- الرؤيسات الأوليّة (Protoscolexes)

وهي تلك التشكيلات التي تتبرعم من الجـــدار الـــداخلي المنـــتش للكيســـة العداريّـــة أو المحـــافظ النسليّة(الشكل3) ، ويتألف من رأس كبير، وجسم صغير، وسويقة ضيقة تلتصق بالغشـــاء المنـــتش، ويمكن لهذه السويقة أن تتمزق وتسمح للرؤيسات بأن تتحرر في وسط السائل العداري، (رمضـــان، 1992) (الشكل3).

ب_ المحافظ النسليّة (Brood capsules)

وهي انتفاخات تشبه الحويصل، تتشكّل من الغشاء المنتش للكيسة العداريّة (الشكل3)، وهي مبطنـــة بالغشاء المنتش الحبيبي الذي تتبرعم منه الرؤيسات الأولية بشكل غير جنسي، ويتطور في داخل كلّ

محفظة نسليّة 10-30 رؤيساً أولياً. ويوجد داخل الكيسة الواحدة عدة مئات من هذه الحويصلات، وقد يكون فيها بين 10- 120 رؤيساً أوليّاً، تنفصل المحافظ النسلية وتغوص في السائل العداري (الخالد، 2002).



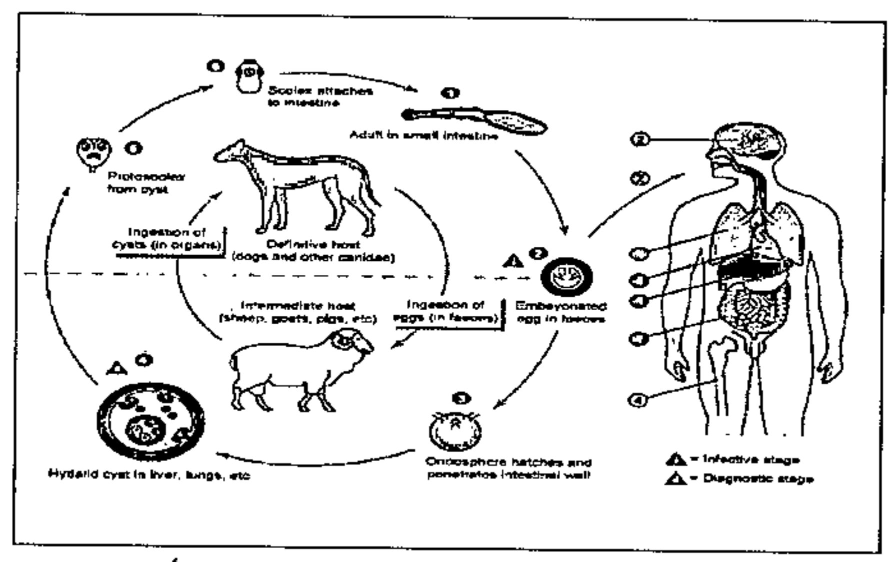
الشكل3. بنية الكيسة العداريّة والمحافظ النسليّة والرؤيسات الأوليّة. مقطع في كيس عداري للمشوكة الحبيبيّة (Morseth ، 1967).

1-4- دورة الحياة(Life Cycle):

يطرح الثوي النهائي (الكلاب) بيوض الديدان أو قطعها الحاملة مع البراز إلى الوسط الخارجي (الشكل4)، وتعدّ القدرة التجددية التكاثريّة للمشوكة الحبيبيّة قليلة بالمقارنة مع غيرها، إذ تطرح قطعة حاملة كلّ 7-14 يوماً، وكلّ قطعة حاملة تحتوي مابين 200 إلى 1500 بيضة كرويّة أو بيضيّة الشكل ذات قشرة ثخينة لونها بني فاتح، مخططة شعاعياً وتحتوي في داخلها على كرة مشوكة (Oncospher) تمتلك ست عقائف تدعى بالجنين سداسي الأشواك، وتتناثر هذه البيوض في الوسط الخارجي، لتنتقل عبر مسافات واسعةٍ في دائرة يصل قطرها إلى حوالى 80م، ويساعدها على ذلك الرياح، والأمطار، والنمل، والخنافس، والطيور، والذباب.... وتحتفظ هذه البيوض بقدرتها الحيويّة في الوسط الخارجي لمدة عامين (رمضان، 1992؛ مجذوب، 2000)، وتبقى قادرة على إحداث الخمج خلال مدة تتراوح بين 3 أيام وحتى سنة كاملة، وذلك بحسب الظروف البيئيّة الموجودة فيها. فهي تستطيع أن تتحمل درجات الحرارة المنخفضة (-30°م) والمرتفعة (+38°م) (Gemmell، 1977)، وتفقد حيويتها خلال يوم أو يومين عند تعرضها للجفاف والحرارة المرتفعة جداً، إلا أن

المياه والرطوبة ودرجات الحرارة المنخفضة تساعد على استمراريّة حيويّة البيوض حتى أشهر(الخالد، 2002).

يتضمن الثوي المتوسط (Intermediated host) مجالاً واسعاً من الثدييّات العواشب (Ungulates) القابلة للخمج (الموظ، الغزلان، الخيول، الخنازير، الإبل، الأغنام، الأبقار). ويحدث الخمج عن طريق تناول الماء والأعلاف والأعشاب الملوثة بالبيوض، التي تصل إلى المعدة والأمعاء الدقيقة حيث تتخرب هناك بفعل الإنظيمات الهاضمة، وتتحرر الأجنة سداسية الأشواك من أغلفتها (Noble وNoble ، 1974؛ الخالد، 2002). تحفز الصفراء الأجنة سداسية الأشواك، التي بدورها، تثقب جدار الأمعاء الدقيقة بمساعدة أشواكها، ويعتقد أيضاً بوساطة مفرزات الكرة المشوكة، ثم تدخل إلى الأوعية الشعريّة الدمويّة الوريديّة أو الأوعيّة اللمفاويّة المساريقيّة، وتنتقل مع تيار الدم لتصل إلى الكبد بعد 12 ساعة، حيث يحتجز الجزء الأكبر منها. غالباً ما تموت أعداد كبيرة منها، ويُستدل على مكانها بحدوث التليّفات وبزيادة الحمضات واللمفاويات(Soulsby، 1987)، أما الجزء الباقي من الأجنة فينجح بتجاوز الجيوب الكبديّة والوصول إلى الرئتين، ونادراً ما تصل إلى الكليتين، والطحال، والعضلات، والدماغ، ونقيّ العظام، وأعضاء أخرى.



الشكل4. دورة الحياة للمشوكة الحبيبية وطرق الخمج، أخذت من

(the Centers for Disease Control and Prevention at http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Echinococcosis.htm).

❶ الدودة الناضجة للمشوكة الحبيبية. ❷ البيوض بداخلها الجنين سداسي الأشواك. ❸ الكرة المشوكة (oncosphere).❹ تطور الكيسات العُدَارِيّة في الكبد والرئتين والدماغ والأعضاء الأخرى. ❺ .الرؤيسات الأولية.❻ (Protoscolexes)الرؤيسات مرتبطة إلى الغشاء المخاطي في أمعاء الكلاب

وفي حالات نادرة، يمكن أن تمر الأجنة مع تيار اللمف على طريق القناة الصدريّة، لتصل إلى القلب والرئتين مباشرة دون المرور بالكبد، وفي هذه الحالة تصاب الرئتان بدلاً من الكبد(Thornton وGracy، 1974؛ Soulsby، 1987)، وحالما تصل الأجنة إلى موقعها النهائي، تستقر هناك وتتطور ببطء شديد إلى سليفة الشريطيّة (الكيسة العُدَاريّة؛hydatid cyst).

تختلف مدة تطور الكيسة، فقد تصل إلى عدة أشهر قبل أن تنتج الرؤيسات الأوليّة (سليفة الشريطيّة المخصبة)، ويعتمد هذا على بنية العضو المصاب (صلابته)، حيث يكون النمو أسرع في الدماغ والرئتين منه في الأعضاء الأخرى (Soulsby، 1987). تصل الأجنة إلى الكبد خلال أربعة أيام فيصبح قطرها أكثر من 250 ميكروناً، وفي هذا الوقت تتضح أولى علامات البنية المثانيّة، وخلال 3 أشهر يصبح قطرها 4-5 مم، بحيث يكون جدار الكيسة بسماكة 1مم (بارودي، 1990). ويستغرق تشكّل الكيسة العُدَاريّة المخصبة قرابة السنة (Andersen وزملاؤه، 1997). كما لاتتمكن كلّ الكيسات العُدَاريّة من إنتاج الرؤيسات الأوليّة لتشكّل ما يعرف بالكيسة العقيمة (Noble وNoble، 1974).

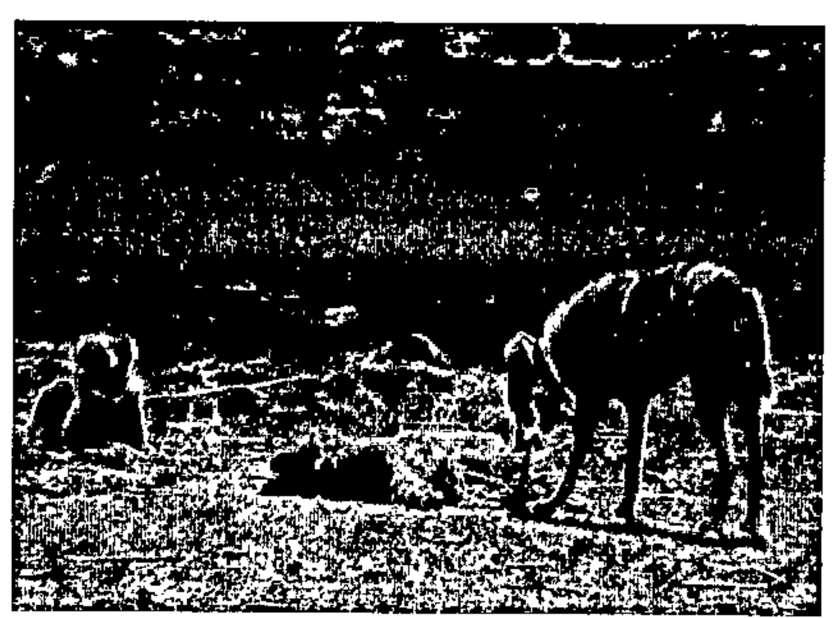
تتوضّع الكيسة العُدَاريّة في الكبد عند الأغنام بنسبة أكبر (62.25%) منها في الرئتين(20.25%) (Bortoletti وزملاؤه، 1989؛ Stoyanov وزملاؤه، 1999؛ Lahmar وزملاؤه، 1999؛ الخالد، 2001)، على عكس الحال عند الأبقار. وفي دراسة أخرى أجريت في ليبيا كانت نسبة وجود الكيسات العُدَاريّة في الكبد هي الأعلى (97.26%)، ثم في الرئتين (58.70%)، ثم الكليتين (1.76%)، ثم الطحال(0.74%)، ثم في كلّ من القلب والعضلات والأغشية المصليّة(0.24%) (Gusbi وزملاؤه، 1987؛ Bortoletti و زملاؤه، 1989). أما في سوريا فقد كانت نسبة وجود الكيسات في الكبد 54.2%، أما في الرئتين فكانت 12.8%، على حين كانت 33% في الكبد والرئتين معاً، أما في الأغنام المستوردة من تركيا فكانت نسبة الكيسات العُدَاريّة في الكبد 39.6% و18.9% في الرئتين، وفي العضوين معاً كانت 41.5% (بارودي، 1990)، بينما وصلت هذه النسبة في دراسة أخرى إلى 36.97% في كبد الأغنام (إصابة مفردة) و 21.11% في الرئتين (إصابة مفردة)، وأما في العضوين معاً(الإصابة المزدوجة)فقد بلغت 39.72%، وكانت في بقية الأعضاء 2.2% (عيد،2005).

توجد الكيسات عادة إما مفردة أو متعدّدة ومختلفة الأحجام، وقد يتشكّل ضمن الكيسة العُدَاريّة كيسات بنات مفردة، أو متعدّدة داخليّة، تدعى بالكيسة الابنة الداخليّة، أو تكون خارج الكيسة وتدعى بالكيسات الابنة الخارجيّة، مع إمكانيّة انفصالها فيما بعد. وجد أن أغلب الكيسات العُدَاريّة في سورية هي كيسات وحيدة المسكن، وأن الحجرات الموجودة فيها هي كيسات ابنة (بارودي، 1990). وفي

حالات استثنائيّة فرديّة، تمّ تشخيص الكيسة العُدَارِيّة في المخيخ عند الكلاب، وفي التجويف البريتواني عند القطط، ومعلوم أن الأحماض الصفراويّة في أمعاء الكلاب تخرب الأجنة سداسيّة الأشواك وتتلفها، وهذا ما يمنع نموها وتطورها إلى كيسات عداريّة، بينما لا تؤثر هذه الأحماض على رؤيسات الكيسة العُدَارِيّة (الخالد، 2002).

تعدّ الكيسات العُدَارِيّة الطور الخامج للثويّ النهائي، وتحتفظ رؤيساتها بقدرتها الحيويّة على البقاء مدة تتراوح بين 3–9 أيام في الوسط الخارجي، عندما تكون محاطة بالحويصلات، وتبقى خامجة في درجات حرارة +4°م مدة 39 يوماً و في الدرجة +20°م حتى يومين فقط، وفي الدرجة – 8°م مدة 24 ساعة (المقداد، 1991). تختلف نسبة الرؤيسات والمحافظ النسليّة من كيسة إلى أخرى، وذلـــك بحسب فعاليّة كلا الطفيلي والثوي، ومكان توضع الكيسة، وسرعة نموها، وذريّة الطفيلي (Soulsby 1987؛ Toncheva و Zhelyaskov، 1999).

يتمّ خمج الثوي النهائي بتناول الأعضاء الداخليّة (الكبد، الرئتين...) المحتوية على كيسات عداريّة مخصبة عن طريق الفم (الشكل5)، تتحرر الرؤيسات في المعدة والعفج بفعل إنظيم الببسين وتغيرات درجة الباهاء (pH) وأملاح الصفراء، حيث تنمو وتتطور في الجزء الأول من الأمعاء الدقيقة إلـــى ديدان ناضجة، والجدير بالذكر أن مدة حياة الديدان الناضجة غالباً لاتزيد على 100 يوم، ثم تصـــبح عقيمة غير قادرة على إنتاج البيوض (عدوي، 1998).



الشكل 5. تناول كلاب الراعي لحيوانات نافقة مصابة بداء الكيسات العُدَارِيّة.

تشكل الكلاب الثوي النهائي بشكل رئيسي في دورة حياة هذا الطفيلي (الشكل5)، وبشكل عام تعدّ الكلبيّات (الثعلب، ابن آوى، الفهد، الضبع) أثوياء نهائيّة. أما القطط فهي غير ناقلة للمرض، فالدودة لاتصل إلى مرحلة النضج الجنسي وإنتاج البيوض في أمعائها (Thornton و Gracy، 1974)، ولا تصاب الكلاب المخصيّة بالمشوكة الحبيبيّة لأسباب هرمونيّة (المقداد، 1991). بينما تشكل ذوات الأظلاف والحافر (الأغنام، الماعز، الأبقار، الخنازير، الخيول، الإبل، الحمير، الفيلة، القردة، الكناغر، الحُمُر الوحشيّة، أفراس النهر) دور الأثوياء المتوسطة.

تشكل الحيوانات البريّة في بعض المناطق دور الثوي النهائي، مشكّلة دورة لاحم/عاشب، مثل: الذئاب/الفئران في شماليّ أمريكا، والجغل/الغزال في سيلون، والقيوط/الغزال في كاليفورنيا، والثعالب/الأرانب البريّة في الأرجنتين، والجغل/ المجترات البريّة في كينيا تدخل كلّها في دورة حيوان لاحم مُفترِس/ عاشب مُفترَس. وفي سردينا توجد دورة كلب/ أغنام (FAO، 1982؛ Bortoletti وزملاؤه، 1990). ويعدّ هذا النوع الأكثر انتشاراً في العالم، لاسيّما الدول المطلّة على حوض البحر الأبيض المتوسط، والشرق الأوسط، والشرق الأقصى (الصين، منغوليا)، وأفريقيا، وأمريكيا الجنوبيّة، وأوروبا (Oie، 2000).

5-1 – الاختلافات بين أنواع المشوكات وداخلها (interspecies and intraspecies):

تمتلك الديدان الناضجة الأعضاء الذكريّة والأنثويّة (ديدان خناث)، لذلك يمكن أن تتكاثر جنسياً أو بالتلقيح الذاتي. ومن المفترض حدوث الطفرات في الأعراس المفردة (البيوض غير الملقحة أو السائل المنوي). مادامت الكيسة العُذَاريّة تتكاثر بشكلٍ لاجنسي بالبرعمة لتنتج عدداً كبيراً من الأعضاء المنفصلة عن بعضها والمتماثلة جينياً (الرؤيسات). ويمكن أن تحدث طفرة واحدة فقط بشكل يتناسب مع تكيف الثوي، فإذا تناول ثوي وسيط عارضي (غير طبيعي) البيوض التي تحتوي على الجنين سداسي الأشواك الذي يحتوي على الجين الطفرة، فإنه يتشكّل بسرعة أعداداً كبيرة من هذه الأنواع الطافرة في داخل الملايين من الرؤيسات الأوليّة (Oie، 2000).

يمكن أن يكون هناك العديد من الاختلافات في البنية التشريحية داخل أنواع (Intraspecies) المشوكات وبين الأنواع (Interspecies). تتضمن المشوكات أربع أنواع فقط، و 15 تحت نوع، و أعداداً هائلة من الذراري. وعلى سبيل المثال، تحت النوع المشوكة الحبيبيّة الحبيبيّة، المشوكة الحبيبيّة الكنديّة. هما الشكل الفعّال عند الكلاب وذوات الأقدام والحافر المستأنسة.

فالمشوكة الحبيبيّة الكنديّة هي تحت نوع نشأت في منطقة باردة جداً في أمريكا الشماليّة، وتُشَكل الثعالب والمجترات البريّة أثويائها في دورة الحياة. ويوجد نوعان على الأقل من متعددة المساكن

وهما المشوكة متعدّدة المساكن متعدّدة المساكن والمشوكة متعدّدة المساكن السيبيرية، أما المشوكة *E.vogeli* والمشوكة *E.oligarthrus* فليس لهما تحت أنواع.

عزلت العديد من المشوكات من أنواع مختلفة من الأثوياء في مناطق جغرافيّة بالاعتماد على اختلافات شكليائيّة معينة بين الأنواع، إضافة إلى الاختلافات البيولوجيّة والبيوكيميائيّة، إذ أنها ذات مفاهيم وبائيّة هامة، إذ سجل Hassan (1991) اختلافات في النشاط البيولوجي أثناء التحليل الكيميائي الحيوي للسائل العُداري والرؤيسات الأولية للإبل والخنازير والأغنام وكذلك في المراحل اليرقية للدودة وعلى سبيل المثال، وجدت إحدى هذه الذراري في قمم المرتفعات في أمريكا الشماليّة، وسميّت بالذّريّة (حيوانات بريّة/غابات)، أو تحت النوع المشوكة الحبيبيّة الكنديّة، التي تتطور في الثعالب والعواشب ذوات الأظلاف والحوافر البرّيّة (Ungulates) مثل الموظ (Moose) وغزال الرنة، ومن الممكن أن تمثّل النمط الطبيعي للقليديات، كأنها تطورت بشكل تدريجي عبر أثويائها الحيوانيّة البرّيّة (Smyth، 1977؛ Thompson، 1978)، ويتصف خمج الإنسان بهذا النمط بتوضعات رئويّة كثيفة أبطأ وأكثر نمواً، إلا أن الأعراض السريرية تكون أقل حدوثاً مقارنة بالأنماط الأخرى.

اكتشفت في بريطانيا ذريّة المشوكة الحبيبيّة كلب/ حصـــان، وهـــي ذات مواصـــفات شـــكليائيّة وبيولوجيّة تختلف عن ذّريّة كلاب/ أغنام (Smyth وSmyth، 1964)، إذ ظهرت مواصفات نمـــو مختلفة في المختبر بين هاتين الذريتين من حيث الاحتياجات الأيضيّة والفيزيولوجيّة، فغياب مظهر الخمج عند الإنسان المعرّض للذريّة كلب/حصان في بريطانيا يشير إلى أنها غير خامجة للإنســـان. كما توجد في الاتحاد السوفيتي اختلافات شكليائيّة وبيولوجيّة بين الذريّة كلب /غنم والذّريّـــة كلـــب /خنزير. فالذّريّة كلب/أغنام غير خامجة للخنازير وعلى العكس من ذلك فإن الذّريّة كلاب/خنازير لا تخمج الأغنام، وهذا ما أشارت إليه تقارير في إيطاليا وأفريقيا. وغالباً ما تعدّ الأبقار فـــي بريطانيـــا وأستراليا أثوياء وسيطة غير ملائمة للكيسة العُدَاريّة إذ أنها تشكّل كيسات طبيعيّـــة ولكنهـــا عقيمـــة لاتحتوي على رؤيسات أوليّة، ولكن في مناطق أخرى مثل جمهوريّة إفريقيا الجنوبيّة وسويسرا تنتشر الكيسات المخصبة في الأبقار. و يظهر في أفريقيا الأسد كثوي نهائيّ مناسب لذريّة المشوكة الحبيبيّة، وفي أستراليا الغربيّة يمكن أن تقوم الأبقار مكان الأغنام في دورة الحياة بشكل دائم، وأما في الهنـــد فتوجد دورة كلب/جاموس. وتتكيف المشوكة الحبيبيّة مع الإبل أكثر من تكيفها مع الحيوانات الأهليّة الأخرى كأثوياء وسيطة في أفريقيا الشماليّة والشرق الأوسط، ويمكن أن تتأثر مواصـــفات الذّريّـــة بالنمط المحلي.

وقد أمكن تحديد تسع ذراري للمشوكة بالاعتماد على الصفات الشكلائيّة والكيمياحيويّة للطفيلي وآليّة تطوره، والاختلافات في الثوي المتوسط والنهائي، وقابليّة الخمج عند مختلف الأثوياء المتوسطة، (Thompson وزملاؤه، 1995) وهي موضحة في الجدول1.

الجدول1. الذراري/ الأنماط الجينية لأنواع المشوكة الحبيبية الحبيبية.

المشوكة الحبيبية الذرية / النمط الجيني G	الثوي المتوسط	الثوي النهائي أو العارضي	مكان الانتشار(a)
الذرية الغنمية G1	الأغنام، الأبقار، الخنازير، الجمال، الماعز، الإنسان، macropods	الكلاب، الثعالب، الجغل، الضبع، الدنغو(Dingo)	أوروبا، أمريكا، نيوزيلانده، افريقية، أمريكا الجنوبية، الشرق الأوسط، روسيا الفيدرالية، جهورية الصين الشعبية
ذرية أغنام تاسمانيا G2Tasmania	الأغنام، الأبقار، الإنسان؟	الكلاب، الثعالب	تاسمانيا، الارجنتين
ذرية الجاموس؟ G3	الجاموس، الإنسان؟، الأبقار؟	الكلاب، الثعلب؟	آسيا
ذرية الحصان G4	الحصان، الفصيلة الخيلية الأخرى	الكلاب،	أوروبا، الشرق الأوسط، جنوب افريقية، نيوزلندا؟، أمريكيا؟
ذرية الأبقار G5	الإنسان والأبقار	الكلاب	أوروبا، أفريقا الجنوبية، الهند، سيرلينكا، وروسيا الفيدرالية
ذرية الجمل G6	الإبل، الماعز، الأبقار؟، الإنسان؟	الكلاب	الشرق الأوسط، إفريقيا، جمهورية الصين الشعبية، الأرجنتين
ذرية الخنزير G7	الخنازير، الإنسان؟	الكلاب	أوروبا، روسيا الفيدرالية، أمريكا الجنوبية
الذرية الفقارية G8 (Cervid a strain)	الفقاريات، الإنسان	الثعالب، الكلاب	امريكا الشمالية، اوراسيوية (Eurasia)
ذرية الأسد(b)	حمار الوحش، الزرافة؟، الجاموس، الضبي؟ - (antelope)، الخنزير البري الأفريقي (wart hog)، فرس النهر؟ (hippopotamus) حيوان النو (wildebeest) الخنزير البري (bush pig)	الأسد	أفريقيا

؟: الحالة غير واضحة. **a**: في بعض الذراري، المجال الجغرافي من الأنماط الوراثية التي قد وصفت بشكل مؤقت باستعمال المعايير الجينية والمورفولوجية تكون محدودة. **b** : غير واضحة الخصائص الجينية، لذلك عزلت بالاعتماد على الخصائص البيولوجية والوبائية.

6-1 – انتشار الكيسات العُذَاريّة:

تعدّ الإصابة بالكيسات العُذَاريّة واسعة الانتشار في العالم، وللأغنام دور هام في نقل الإصابة في مناطق تربيتها المكثفة (أمريكا الشماليّة والوسطى وشماليّ أمريكا الجنوبيّة، ودول أوروبا المطلة

على البحر المتوسط، والشرق الأوسط، وآسيا، وأستراليا وأفريقيا) (Cabrera وزملاؤه، 2001). وفي الدول الأخرى مثل: بولندا، النيجر، أوكرانيا.... ، التي تكون رعاية الأغنام فيها قليلة الأهميّة، حيث تقوم الخنازير مقامها. وتحتل الإبل الدور الأهم في نقل الإصابة في أفريقيا، والخيول في غرب أوروبا وبريطانيا (Schantz وزملاؤه، 1980). وتتميّز الإصابة بداء الكيسات العُدَاريّة بأنها كثيرة الانتشار في دول شرق البحر الأبيض المتوسط وغيرها من البلدان (إيران، الباكستان، الهند، بنغلادش، الصين، فيتنام، البلاد العربيّة) (Matossian وزملاؤه، 1977).

إن نسبة الانتشار في الأغنام ترتبط بشكل رئيسي مع الحلقة الرئيسيّة للتطور الطفيلي (كلاب/ أغنام)، وبعمر الحيوان وسلالته، وبنظام التربية (سرحيّة، أو مغلقة)، كما تباينت نسبة الإصابة بين دولة وأخرى من جهة، وبين منطقة وأخرى في البلد الواحد، وحسب طبيعة هذه المنطقة (جبليّة، أو سهليّة) وبين عام وآخر من جهة أخرى (Toncheva و Zhelyaskov، 1999؛ الخالد، 2001). شخصت الكيسات العدارية لأول مرة عند الأغنام السورية في عام 1936 (Turner وزملاؤه، 1936)، فقد بلغت نسبة الإصابة في دمشق وحمص وحلب 28.5%، 41.4%، 27.8% على التوالي. تلتها دراسات أخرى قدرت نسبة الإصابة بـــ 30% (Pipkin وزملاؤه، 1951)، وأظهرت دراسة أخرى أجريت على الأغنام في عام 1988 انخفاضاً في نسبة الإصابة (8.43%)، وكانت مرتفعة نسبياً عند الحيوانات التي يزيد عمرها على السنتين (15.56%)، وانخفضت عند الأغنام التي يقل عمرها عن السنتين إلى 3.51%، كما كانت النسبة متباينة بين الأغنام المستوردة والبلديّة، فبلغت 21.1% و 8.43% على التوالي (بارودي، 1990). بينما سجل الخالد (2001) نسبة بلغت نحو 9.96% في الأغنام العواس في سورية في كل من نظامي التربية السرحي والمغلقة، لكنها كانت أعلى في النظام السرحي (32.44%) منها في النظام المغلق (1.29%)، وارتفعت هذه النسبة عند الحيوانات المتقدمة بالعمر والتي يزيد عمرها على السنة (29:35%) مقارنة بالحملان التي يقل عمرها عن العام الواحد(7.09%). بينما وصلت النسبة إلى 2.8% في عام 1993 (Seimenis، 2003). بينما بلغت نسبة الإصابة بالكيسات العُدَاريّة نحو 24% في دراسة وبائيّة أنجزت عند الأغنام في سورية (عيد، 2005). في حين سجل الياسين وكروالي (2011) نسبة انتشار عالية بلغت نحو49.20% في الأغنام العواس السورية التي زاد عمرها على سنة، مما يشير إلى الأهمية الكبرى لتوجيه الجهود للتخلص من هذا المرض فهو يشكل خطر حقيقي.

سجلت إصابات كثيرة في الدول المجاورة لسورية أيضاً، حيث كانت منخفضة في شماليّ الأردن إذ تراوحت بين 1.33 و4.5% (Al-Yaman وزملاؤه، 1985، Rahman وزملاؤه، 1992)، في حين وصلت هذه النسبة في لبنان إلى 6.6% (Pipkin وزملاؤه، 1951)، و23.1%

(Luttermoser و Koussa، 1963). أما في شماليّ العراق، فقد تراوحت نسبة الإصابة بين 4 و33%(Ali، 1993؛ Seimenis، 2003). أما في ليبيا فقد بلغت 7.85% (Gusbi و زملاؤه، 1987)، ثم إرتفعت النسبة فتراوحت بين 4.3 و75% (Khan وزملاؤه، 2001؛ Seimenis، 2003). وبلغت في تونس حوالي 9.6% (Lahmar وزملاؤه، 1999)، وفي الجزائر 14.3% (Euzeby، 1982؛ Skander و Larbaoui، 1992). أما في المغرب فقد سجل برطال وزملاؤه (1983) بعملهما الذي استمر خلال الفترة 1970-1980، إذ كانت نسبة الإصابة 5% فقط، وفي دراسة أخرى أنجزت في عام 1983 بلغت نسبة الإصابة نحو4.91%، وهي متقاربة مع نتائج الدراسة السابقة (Dakkak وزملاؤه، 1983)، ومع نتائج الدراسة التي أجريت عام 1988 حيث بلغت النسبة 5.3% (Pandey، 1988). إضافة إلى انتشار الإصابة في دول شماليّ أفريقيا، فقد أظهرت الدراسات وجود الإصابة في دول أخرى مثل نيجيريا بنسبة 7.1% (Dada وزملاؤه، 1979)، ودلتا النيجر في نيجريا بنسبة 24%(Arene، 1985)، وأثيوبيا (16.4%) (Bekele وزملاؤه، 1988)، أما في الدول الأوروبيّة المطلة على البحر الأبيض المتوسط، فقد ذكر Seimenis (2003)، أن نسبة إصابة الأغنام بالكيسات العُدَارِيّة تراوحت بين 0.23-21%، في الفترة 1989-1998، وتراجعت نسبة انتشار الإصابة نتيجة لتطبيق برنامج التحكم بالكيسات العُدَارِيّة بمعالجة الكلاب الأهليّة. كما أظهرت دراسة أخرى أن الأغنام ذات التربية السرحيّة كانت أكثر عرضة للإصابة من الأغنام ذات التربية المغلقة ضمن الحقول المسيجة، إذ بلغت 86.7% و 1.6% على التوالي، إضافة إلى ذلك، تباينت نسب الإصابة من منطقة إلى أخرى، حيث كانت 79.4% في ولاية Oristano ، و95% في مقاطعة Nuoro في سردينيا (Bortoletti وزملاؤه، 1989)، أما في شماليّ إيطاليا فكانت منخفضة جداً (1%) (Battelli وزملاؤه، 2002)، بينما كانت مرتفعة في بلغاريا، إذ تراوحت بين 26 و 40% (Stoyanov وزملاؤه، 1999)، وكانت جميع الأغنام المدروسة في اليونان مصابة (Himonas وزملاؤه، 1994). كما لوحظ تبايناً في نسب الإصابة بين المناطق المرتفعة والسهليّة في بلغاريا، فكانت النسبة عالية في المناطق المرتفعة، إذ بلغت 50% في مقاطعة Plovdiv، بينما انخفضت في المناطق متوسطة الارتفاع إلى 29.4%، و وصلت في المناطق السهليّة إلى 19.2% (Toncheva و Zhelyaskov، 1999).

بينت الدراسات بشكل عام أن الإصابة بالكيسات العُدَارِيّة تزداد مع تقدم الحيوان بالعمر، حيث تزداد فرصة إصابة الحيوان، وبازدياد عمر الكيسة تصبح واضحة ومن السهل الكشف عنها (Dajani و Khalaf، 1981؛ برطال وزملاؤه، 1983؛ Al-Yaman وزملاؤه، 1985؛ Pandey وزملاؤه، 1988؛ Lahmar وزملاؤه، 1999).

1-7 - المناعة في الثوي المتوسط (Immunity in the intermediate host):

يقسم علم المناعة ضد داء الكيسات العُدَارِيّة إلى مرحلتين رئيسيتين هما: مرحلة ما قبل تشكل الكيسات (Pre encystment phase) ومرحلة ما بعد تشكل الكيسات (Post encystment phase) (Rickard و Williams، 1982)، حيث يمكن التمييز بينهما من خلال تشكيل الطبقة الصفائحية (Laminated layer) حول الكيسة العُدَارِيّة، إذ تتشكل بين الأسبوع الثاني والرابع بعد ابتلاع الثوي المتوسط (الحيوان أو الإنسان) للبيوض وتحرر الكرة المشوكة (Oncosphere).

1-7-1 - المقاومة الأولية والمناعة المبكرة (Innate resistance and early immunity)

1-7-1-1- الخمج الأولي (Primary infection):

مازالت المعلومات ضحلة حول العوامل المؤثرة في حساسية المناعة الفطرية عند الخمج بداء الكيسات العُدَارِيّة بعد ابتلاع البيوض المخصبة وتشكيل الكيسات الأولية (primary cysts)، حيث يمكن أن يؤثر عمر الثوي وجنسه وحالته الفيزيولوجية في القابلية الأولية للخمج (Innate susceptibility) أو مقاومته (Rickard و Williams، 1982) وعلاوة على ذلك، فقد أظهر خمج الفئران التجريبي ببيوض المشوكة الحبيبية أو الكرات المشوكة بأن قابلية الإصابة (Susceptibility) تختلف باختلاف ذراري الفئران (Dempster وزملاؤه، 1991). رغم أن الأبقار حساسة بشكل طبيعي للإصابة بالمشوكة الحبيبية غير أن الكيسات المتشكلة تنمو بشكل متغاير إذ تكون غير خصبة بحيث لاتنتج محافظ نسيلية (Brood capsules) أو رؤيسات أولية (Thompson وزملاؤه، 1984). على النقيض من ذلك، عادة ما تكون كيسات الأغنام خصبة بشكل كامل مع محافظ نسلية إذ تتكاثر لاجنسياً بالتبرعم من الغشاء المنتش وتتطور الرؤيسات الأولية من الجدار الداخلي (Inner wall) للمحافظ النسليه. وهذا ما يؤكد بأن تلك الاختلافات ناتجة عن اختلاف ذراري المشوكة الحبيبية، ونفس الوضع يسري في الأبقار والأغنام من المنطقة نفسها التي يستوطن فيها الخمج (Judson وزملاؤه، 1985؛ Chi وزملاؤه، 1990؛ Zhang وزملاؤه، 1994). وهذا يعني أن الأبقار لديها بعض المناعة الطبيعية التي تثبط نمو وتطور الرؤيسات الأولية. على النقيض من ذلك، تبدي الأغنام قابلية عالية للخمج. فقد أظهر الخمج التجريبي للأغنام ببيوض المشوكة الحبيبية تشكل نسبة عالية من الكرات المشوكة (32-48%) بقيت على قيد الحياة وتطورت إلى كيسات ناضجة، ولذلك من المتوقع أن الأغنام لديها مقاومة محدودة للخمج الأولي (Yong وزملاؤه، 1984).

يمكن الكشف عن الغلوبولينات المناعية IgG بشكل مبكر لدى الاستجابة لمستضدات سائل الكيسات العُدَارِيّة (HCF)، وذلك بعد الخمج بنحو 2 و11 أسبوع في الفئران والأغنام على التوالي (Rodriguez Torres وWisnivesky، 1978؛ Yong وزملاؤه، 1984)، وبعد 4 أسابيع في القردة (Vervet Monkeys) (Rogan وزملاؤه، 1993). ويمكن أن تترافق الأخماج المبكرة مع الاستجابات الالتهابية الخلوية المميزة (Lloyd، 1987؛ Rickard و Williams، 1982) التي يمكن أن تسبب تغيرات مرضية (Finkelman وزملاؤه، 1991؛ Allen و Maizels، 1996)، حيث توجد زيادة في الخلايا البيضاء الحمضات واللمفاويات والبالعات الكبيرة بشكل رئيسي من 3 إلى 5 أيام بعد خمج الأغنام (Petrova، 1968) مع أن الكرات المشوكة والخلايا المحيطة المتنخرة تتبع بارتشاح العدلات والبالعات. وتشكل المراحل المبكرة للمرض فاعلية واضحة للمناعة المتواسطة بالخلايا (cell- Mediated Immunity) ضد الطفيلي (Fotiadis وزملاؤه، 1999). وقد أظهرت التجارب في المختبر (In vitro) أيضاً أن العدلات تعمل بالتشارك مع الأضداد على قتل الكرات المشوكة (Rogan وزملاؤه، 1992).

1-7-1-2- الخمج الثانوي (Secondary infection):

تستحدث الأخماج الثانوية تجريبياً في الفئران عن طريق حقن الرؤيسات الأولية في البريتوان، حيث تحاط بارتشاح خلوي ملحوظ خلال 3 أيام، مؤلف من البالعات النشطة بشكل أولي ثم يعقبها العدلات والحمضات واللمفاويات (Richards وزملاؤه، 1983؛ Riley وزملاؤه، 1985، 1986). وقد فرزت خلايا الطحال (Splenocystes) السيتوكينات (IL-10، IL-4، IL-5) في الزجاج في المختبر إذ كشف عليها مبكراً بعد أسبوع واحد من الخمج (Dematteis وزملاؤه، 1999)، ومستويات عالية من عامل النخر الورمي ألفا (TNF-α) والانترفيرون غاما (IFN-γ) Gamma interferon والسيتوكين IL-6 وIgG1 كانت قابلة للقياس في المصل، بينما كانت IgG3 قابلة للقياس في تجويف البريتوان باستعمال المستضدات الجسمية للرؤيسات الأولية (Haralabidis وزملاؤه، 1995؛ Dematteis وزملاؤه، 1999).

يسبب الخمج المبكر بالرؤيسات الأولية للطفيلي (المشوكة الحبيبية) تشكل أضداد IgM وIgG3 بشكل رئيسي من خلال التحفيز بآليات T-independent mechanism (Baz وزملاؤه، 1999). وبشكل مشابه، فقد ظهرت اختلافات في قابلية الإصابة للمشوكة متعددة الحجرات في كلا الخمج الأولي والثانوي وذلك باختلاف ذراري الفئران المختلفة (Frosch وزملاؤه، 1993؛ Emery وزملاؤه، 1996، b1997؛ Guerret وزملاؤه، 1998؛ Bauder وزملاؤه، 1999؛ Dai و

Gottstein، 1999). وتعتمد الحيوانات الحساسة والحيوانات المقاومة للمرض نشاط مختلف لـلخلايا التائية التي تحمل الواسمة $CD4^+$ من الاستجابة المناعية المتواسطة بالخلايا التائية (Playford و Kamiya، 1992؛ Bauder وزملاؤه، 1999؛ Dai و Gottstein، 1999)، أظهرت الفئران المخموجة مخبرياً بالبيوض أن الانترفيرون غاما والسيتوكينات IL-2 و IL-4 في الآفات الطفيلية غير قابلة للكشف في المرحلة المبكرة من الخمج لكنها كانت موجودة في النهاية، وبشكل مماثل ظهرت بمستويات منخفضة في الأمصال في بداية الخمج، وبمستويات عالية كانت قابلة للكشف لاحقاً (Bauder وزملاؤه، 1999). ويمكن أن تقاس كميات صغيرة من السيتوكين IL-10 بشكل مبكر من الخمج، بينما توجد مستويات عالية منه قابلة للكشف في المراحل الأخيرة من المرض. وقد لوحظت وجود استجابة مناعية معوية نوعية للأجنة سداسية الأشواك قوية في المرحلة المبكرة للخمج (Petrova، 1968). وتمايزت في الفئران أيضاً كلا تحت أنواع (Subsets) الخلايا التائية التي تحمل الواسمة $CD4^+$ (Th1 وTh2) في داء الكيسات السنخية الأولية. تشكلت مستويات منخفضة من سيتوكينات Th2 والأضداد IgG2a وIgG3 وIgM1 في في المراحل المبكرة من خمج الفئران بالمشوكة السنخية (*Alveolar Echinococcus*)، وقد ازدادت تلك المستويات في المراحل اللاحقة (Emery وزملاؤه، a1997). ولم ترتبط درجة المناعة في الفئران بالحساسية للخمج بالمشوكة متعددة الحجرات.

1-7-1-3- الكيسات المتشكلة (Established cysts):

بالمقارنة مع ما يحدث خلال مرحلة الخمج المبكر فقد حظيت الاستجابة المناعية ضد الكيسات المتشكلة اهتماماً كبيراً. فقد يتكرر ارتفاع مستوى الأضداد لاسيّما للأنماط الضدية (Serotypes) IgG و IgM و IgE عند الانسان (Dessaint و زملاؤه، 1975؛ Craig، 1986؛ Heath، 1986؛ Pinon وزملاؤه، 1987؛ Ramzy وزملاؤه، 1999؛ Sterla وزملاؤه، 1999؛ Daeki وزملاؤه، 2000). كان عند الأشخاص الايجابيين مصلياً (Seropositive) ميول لسيادة الأضداد التي تعرفت على المستضد Ag-5 والمستضد Ag-B على التوالي (Aceti وزملاؤه، 1993؛ Daeki وزملاؤه، 2000؛ Ioppolo وزملاؤه، 1996؛ Shambesh وزملاؤه، 1997؛ Sterla وزملاؤه، 1999؛ Wen و Craig، 1994). يحصل في مرحلة تشكيل الكيسات ارتشاح خلوي للحمضات والعدلات والبالعات والخلايا الليفية (Fibrocytes) (Archer و زملاؤه، 1977؛ Ali-Khan و Siboo، 1980 a،b؛ Slais و Vanek، 1980؛ Richards وزملاؤه، 1983؛ Riley وزملاؤه، 1985؛ Arias Irigoyen و Sanchez، 1995؛ Rigano وزملاؤه، 1996) وبشكل

عام لا تتشكل استجابة التهابية حادة، إذ تحاط الكيسات المعمرة بطبقة ليفية حيث تفصل الطبقة الصفائحية (Laminated layer) عن أنسجة الثوي المتوسط، وتعد كثرة الحمضات وإنتاج مستويات عالية من IgE ظاهرة شائعة عند الخمج بالديدان (Capron و Dessaint، 1992؛ Bell، 1996). تحفز الحمضات لمقاومة المراحل النسيجية للطفيليات بحيث لاتسطيع الخلايا البالعة بلعمتها (Haynes و Fletcher، 1990). تحفز بشكل أولي الضد IgE المعتمد على تفاعل الخلايا البدينة (ماست) (IgE- dependent mast cell reaction) لتتوضع الحمضات قرب الطفيلي وتنتج العوامل المضادة للطفيليات (Bell، 1996)، ولكن الحمضات أقل بلعمة من العدلات إذ تشبهها من حيث قدرتها على قتل المراحل اليرقية مثل المشوكة (Rainbird و زملاؤه، 1998) بوساطة كلا الآليات التابعية والمستقلة (Dependent and independent mechanisms) وتحفز فعاليتها بوساطة السيتوكينات (Butterworth، 1984).

يتشكل في الجسم المصاب بداء المشوكات العدارية نوعين من الخلايا اللمفاوية (Th1، Th2) بشكل واضح، إذ أن خلايا Th1 تفرز IL-2 و γ -IFN واللمفوتوكسين، بينما تفرز خلايا Th2 كلا من السيتوكينات IL-4 و IL-5 و IL-6 وIL-10 . وتكون أنماط خلايا Th1 و Th2 واضحة وثابتة في المزارع النسيجية وعادة ماتكون مثبطة تصالبياً. يثبط IFN-γ تكاثر خلايا Th2 بينما يثبط السيتوكين IL-10 تركيب سيتوكينات Th2 في الخمج العُداري. أنتجت مستويات عالية من IL-4 و IL-5 و IL-6 و IFN-γ في المختبر في الزجاج بوساطة الخلايا وحيدة النواة في الدم المحيطي (PBMC)، إذ عزلت من البشر المخموجين وحفزت بوساطة مستضدات السائل العُداري (Rigano وزملاؤه، 1999، 1996). كما تشكلت مستويات عالية من السيتوكينات أيضاً في أمصال المرضى بالكيسات العُداريّة في الإصابة الرئوية والكبدية (Touil-Boukoffa وزملاؤه، 1998). قد يفسر التعبير المشترك لكل من السيتوكين IL-10 و IFN-γ عند مستويات مرتفعة في البشر المصابين بداء الكيسات العُداريّة بأنه من الممكن أن تنظم أو تضبط الاستجابة المناعية لداء الكيسات العدارية بكلتا الخلايا Th1 و Th2 ، ومن غير الواضح لماذا الخمج بالكيسات العُداريّة قادراً على انتاج مستويات عالية لكلتا الخلايا Th1 و Th2، طالما عادة ما تحفظ بعضها الأخر (Pearce وزملاؤه، 1991). إذ يمكن أن تعزى إلى وجود خليط معقد جداً من المستضدات في الكيسات العُداريّة (McManus و Bryant، 1995). ومن المحتمل أنها تحتوي على محددات مستضدية نوعية (Epitopes) لكل من تحت مجموعة الخلايا التائية (T-cell subset). على أية حال، الوضع في الإنسان صعب التفسير طالما نادراً ما تستخدم خلاياTh1 في المراحل المتأخرة من الخمج المزمن (Abbas وزملاؤه، 1996). تسود سيتوكينات المجموعة الخلوية Th1 في البشر الذين يخضعون للمعالجة الكيميائية أكثر

من سيتوكينات المجموعة الخلوية Th2 نوعاً ما (Rigano وزملاؤه، b1995). قد يكون أحد الآليات القاتلة التي توجد في المراحل المتأخرة من الخمج (Rogan و Craig، 1997). وهناك زيادة واضحة لكل من السيتوكين IL-4 و IL-10 في مرضى داء الكيسات العُدَارِيّة، إضافة إلى وجود مستويات عالية من الأضداد IgE و IgG4 (Rigano وزملاؤه، b1995). كما تنظم السيتوكينات IL-4 و INF-γ استجابات كل من IgE و IgG4 (King و زملاؤه، 1993؛ King و Nutman، 1993؛ Mosmann و Sad، 1996). ينتكس مرضى داء المشوّكات الكيسيّة تجريبياً، مع ميول لإنتاج السيتوكين IL-5 ولكن بشكل أخفض من INF- γ مترافقة بمستويات عالية من الأضداد IgE و IgG4 مقارنة مع المرض بالخمج الأولي (Godot وزملاؤه، 1997). إضافة إلى إنتاج IL-4 و IL-10 تنتج كميات كبيرة من سيتوكينات المجموعة الخلوية Th2 و IL-5 و IL-6 في مرضى الكيسات العُدَارِيّة. وقد استحثت مستضدات الطفيلي السيتوكين IL-5 في 90% من المرض بينما كانت سلبية في الشاهد. وقد أظهرت دراسات أخرى أن السيتوكين IL-5 يترافق بتنظيم الأضداد IgG4، IgE النوعيتين (Rigano وزملاؤه، 1996). عموماً يقوم السيتوكين IL-5 أيضاً على تنظيم استجابة الحمضات (Clutterbuck وزملاؤه، 1989؛ Hernandez وزملاؤه، 1997). على أية حال، لوحظ ارتفاع محدود من الحمضات في 11% من مرضى المشوكة الكيسيّة (Cystic echinococcosis) (Rigano وزملاؤه، 1997)، وأغلب مرضى المشوكة متعددة الحجرات (Sturm وزملاؤه، 1995؛ Rigano وزملاؤه، 1996). ويتراوح تركيز السيتوكين IL-6 بين 2 و 500 وحدة دولية/مل في أمصال المرضى بالكيسات الحية، إذ يكمن الدور الرئيسي لهذا السيتوكين في تحفيز الخلايا البائية المختلفة للتحول إلى خلايا بلازمية، ومن ثم انتاج الأضداد، لذلك فهي تسهم في تطوير الاستجابات الخلطية النوعية للمستضد.

يتشكل لدى المرضى بالمشوكة الكيسيّة الانتكاسي مستويات عالية من IgG4، IgE ومستويات متزايدة من IL-4 و IL-5 و IL-10 ومستويات منخفضة من INF-γ حيث أنتجت في المختبر بوساطة الخلايا PBMC مقارنة مع المرض بالخمج الأولي (Rigano وزملاؤه، b1995، 1996). وعند المرضى بالخمج الأولي مستويات عالية من INF- γ و IL-5 و IL-2 . يتوافق المستوى العالي من IL-5 مع المستويات العالية من IgG4، IgE (Rigano وزملاؤه، 1996). فقد كانت مستويات INF- γ و IL-6 قابلة للكشف في أمصال المرضى بداء الكيسات العُدَارِيّة الكبديّة الذين أصيبوا بانتكاسة (Touil-Boukoffa وزملاؤه، 1997). هناك ارتباط قوي بين إنتاج الأضداد IgG4 و IgE في أمصال المرضى بداء الكيسات العُدَارِيّة، مع ميول باتجاه زيادة السيتوكينات IL-4 و IL-10 في المرضى الذين أنتجوا مستويات عالية من IgE و IgG4 (Rigano

وزملاؤه، a1995). تشكلت مستويات عالية من IL-2 لدى تحفيز خلايا PBMC بشكل نوعي بمستضدات السائل العُداري في مرض داء الكيسات العُدَارِيّة أكثر من المانحين غير المصابين (Hernandez وزملاؤه، 1997).

يحرض الخمج الأولية والثانوية استجابات متماثلة، إذ تتضمن مستويات مرتفعة من TNF-α و IL-1 و IFN-γ وIL-6 وIL-10 (Haralabidis وزملاؤه، 1995)، ومستويات قابلة للكشف منIgG1 و IgG3 النوعيتين (Dematteis وزملاؤه، 1999). ترتفع مستويات الأضداد IgM و IgGa2 بشكل طفيف عقب الخمج ويبقى مرتفع خلال 18 أسبوع الأولى من الخمج أي خلال 129 إلى 209 أيام بعد الخمج. كما توجد زيادة في مستوى إفراز IL-10 وانخفاض بطيء في مستويات IL-6 و IFN- γ. وتكون مستويات الأضداد IgM و IgGa و IgG2a وIgG1 مستقرة خلال هذه الفترة، بينما تبلغ مستويات IgG3 و TNF-α أعلى قيمة لها في اليوم 190 بعد الخمج، من خلال تلك المعطيات يمكن أن يستنتج بأن سيتوكينات الخلايا اللمفاوية Th2 تحفز المناعة المتواسطة بالخلايا بالتوازي مع الاستجابات الالتهابية المتواسطة بالخلايا Th1 وهي هامة للدفاع عن الثوي ضد سليفة الشريطية (الكيسة العُدَارِيّة) (Aminzhanov، 1980). تكون التفاعلات الالتهابية الموضعية للرؤيسات الأولية في موضع الحقن مجهدة وتشترك مع العدلات والحمضات والخلايا البدينة (Mast cells) والبالعات الكبيرة (Riley وزملاؤه، 1986).

سجلت مستويات عالية بشكل مميز من السيتوكين IL-10 (Wellinghausen وزملاؤه، 1999)، والسيتوكين IL-5 (Riley وزملاؤه، 1985؛ Sturm وزملاؤه، 1995) في مرضى داء الكيسات العُدَارِيّة أكثر من الشاهد، على النقيض من ذلك، تشكلت مستويات من السيتوكين IL-4 قابلة للقياس في عدد قليل من المرضى والشاهد. وكانت مستويات IL-12 قابلة للمقارنة بين المرضى بداء الكيسات البنخية والشاهد وأظهرت نمط توزيع متماثل للسيتوكين IL-10 مع تقدم عمر المرض. وبذلك يمكن أن تحدث الاستجابة المناعية السائدة بـــ Th2 في الحيوان المخموج بالمشوكات السنخية.

1-7-1-4- تثبيط نمو الكيسات (Inhibition of cyst growth):

لا تتأثر المشوكات عادة بالاستجابات المناعية خلال مراحل التطور، لكن يمكن أن تقتل بعض الكيسات خلال المراحل المتأخرة من التطور في الأخماج الطبيعية في الأغنام (Zhang و Zhao، 1992) مع حدوث تكرار نسبي للموت أو تكلس الكيسات أو تنكرزها. وينتج هذا عن تكلس الكيسات الأولية حيث يتملىء التجويف بشكل كامل بالخلايا البيضاء والرؤيسات الأولية (Sturm وزملاؤه، 1995) وهذه ليست دليلاً على أن موت الكيسات ناتجاً عن الظواهر المناعية، لكن من المحتمل أن

تشكل الاستجابة المناعية دوراً هاماً في موت الطفيلي. حيث يمكن أن تزداد الاستثارات المناعية بشكل واضح مع تطور الكيسات. لسوء الحظ لاتوجد دراسات مفصلة حول الآليات المناعية المترافقة مع تنكس الأنماط المختلفة، ولذلك فإن الآليات التي تشترك فيها غير معروفة بدقة. وقد يكون للواسمة $CD4^+$ الموجودة على الخلايا اللمفاوية تأثيراً على ضبط مثل هذه الآليات المناعية، إضافة إلى تأثير IFN-γ وإنتاج أوكسيد النتريك (Nitric oxide) (Touil-Boukoffa وزملاؤه، 1998).

تساهم المتممة من خلال المؤثرات المتواسط بمكونة المتممة C5 (C5-mediated effectors) في دفاعات الثوي بوساطة كلا من تحديد تشكيل الخمج والتحكم في نمو الكيسات المتشكلة. ويمكن أن يتشارك هذا الإسهام مع مقدرة C5a لتزيد من ارتشاح الحمضات (Kassis وTanner، 1976؛ Diaz وزملاؤه، 1999).

تتحلل الرؤيسات الأولية للمشوكة الحبيبية والمشوكة متعددة الحجرات بوساطة مزيج من المصل الطازج من أنواع مختلفة من الثدييات (Herd، 1976؛ Kassis و Tanner، 1976)، إن وجود كيسات المشوكة تستنزف متممة الثوي (Herd، 1976؛ Kassis و Tanner، 1977 a ،b). إذ يترافق التطور السريع لخمج المشوكة متعددة الحجرات مع استنزاف متممة المصل. يتشكل السيتوكين IL-6 بشكل لانوعي في الأخماج العُدَارِيّة (Van Snick، 1990). غير أن إنتاج السيتوكين IL-5 يظهر نوعية المستضد. هناك ارتباط واضح بين إنتاج السيتوكين IL-5 وتعبير IgE وIgG4 في الداء العُداري (Rigano وزملاؤه، 1996)، وتتشكل مستويات عالية من الأضداد IgG1 و IgG4عندما تنمو كيسات المشوكة الحبيبية، حيث تنخفض تراكيز IgG1 و IgG4 النوعيتين في الحالات التي تميزت بارتشاح الكيسة أو تكلسها. ويشير ذلك إلى أن استجابة الضد IgG4 أيضاً مترافقة مع تطور الكيسة ونموها وتقدم المرض، إذ تتشكل استجابات الأضداد IgG1 و IgG2 و IgG3 بالدرجة الأولى عندما تنثقب الكيسات أو تتخرب من قبل الثوي (Daeki وزملاؤه، 2000). بقيت الرؤيسات الأولية في الخمج التجريبي على قيد الحياة قادرة على تشكيل الكيسات بنسبة أقل من 10% (Pennoit-De Cooman وزملاؤه، 1974؛ Zhang وزملاؤه، 2001)، يحدث قتل الطفيلي بشكل رئيسي خلال الأسبوعين الأولين بعد الخمج، حيث تشترك البالعات النشطة في قتل الرؤيسات الأولية (Baron و Tanner، 1977؛ Ali-Khan و Siboo، 1980 a،b؛ Jenkins وزملاؤه، 1990).

أوضحت الدراسات في المختبر بأنه يمكن أن يزداد قتل الرؤيسات الأولية عن طريق البالعات الكبيرة بوساطة IFN-γ (Kanazawa وزملاؤه، 1993)، وتنخفض بوساطة بعض السيتوكينات مثل IL-10 أو IL-4 (Jenkins وزملاؤه، 1990)، لذلك يبدو بشكل مشابه أنه خلال الخمج الثانوي

أصبحت تأثيرات استجابات الخلايا Th1 في قتل الطفيليات مستقطبة لاستجابات من نمط Th2، وتبدو هذه الاستجابات أقل فعالية، وهذا يدعم بالدراسات على المرضى الذين يخضعون للعلاج بالبندازول، إذ تشكلت لديهم استجابة واضحة للعلاج عند إعطائهم سيتوكينات المجموعة الخلوية Th1 بشكل عالي جداً أكثر مما لو كان لديهم سيادة عالية من سيتوكينات المجموعة الخلوية Th2.

8-1 - المناعة في الثوي النهائي (Immunity in the definitive host):

لقد أنجزت أبحاث قليلة على الاستجابات المناعية للمشوكات والعائلة الشريطية في أثويائها النهائية، ويمكن أن يكون هذا بسبب وجود الديدان الناضجة في تجويف الأمعاء (Gut lumen). حيث يعتقد أنها تثير بشكل غير مرغوب استجابات المناعة الجهازية وأيضاً استجابات المناعة الواقية للثوي عند تكرار الخمج بالشريطيات في ذلك الوقت (Lightowlers، 1990)، وتشكل المناعة المخاطية (Mucosal immunities) في الحيوانات ظاهرة هامة. يترافق في الأغنام تنظيف الممسودات الطفيلية –الأسطونية الشعرية كولوبريفورمس (Tr.colubriforms) وهيمونكس كونتورتس– مع تحسس الخلايا البدينة المخاطية (Mucosal mast cells) المقاسة بتحرير إنظيم بروتياز الخلايا البدينة وعدد من الخلايا البيضاء الحبيبية، حيث من الممكن أن تزال الحبيبات بوساطة الخلايا البدينة المخاطية (Stankiewicz وزملاؤه، 1993). تتواجد أنماط الخلايا هذه بأعداد كبيرة جداً في المناطق التي تتوضع فيها الطفيليات في المسار المعوي المعدي(Bendixsen وزملاؤه، 1995). وتتشارك الزيادة في المستويات المناعية، بأنظيم بروتياز الخلايا البدينة الغنمية ومركبات تثبيط الهجرة اليرقية، وPeptidyl leukotriene، في تنظيف الخمج بالأسطونية الشعرية كولوبريفورمس (Jones وزملاؤه، 1994) وتقليل عدد البيوض في روث الحيوانات المصابة (Douch و زملاؤه، a1996).

يمكن أن تشكل إفرازات من الخلايا البدينة المخاطية ومثبطات الهجرة اليرقية الآلية الرئيسية لإزالة الطفيلي (Douch وزملاؤه، b1996). وتعد الأضداد IgA و IgE هامة في مناعة الغشاء المخاطي طالما أنها ترتبط مباشرة مع المستضدات، وأيضاً خلايا Attract effector cells التي ترتبط بالناحية الثابتة من الضد (Constant region)، ترتبط الحمضات والخلايا البدينة المخاطية بالنواحي القابلة للتبلور للغلوبينات المناعية (Fc-receptors)، وتصبح فعالة لإزالة الحبيبات عندما ترتبط مع الطفيليات المهضومة (Opsonized). وتشكل الأضداد المعتمدة على الانسمام الخلوي المتواسط بالخلايا آلية مهمة لتخريب الطفيليات متعددة الخلايا (Riffkin وزملاؤه، 1996).

كما سجل Heath (1986، 1995) بأن رؤيسات المشوكة الحبيبية الناضجة تتصل مع تحت مخاطية الأمعاء الدقيقة للكلاب بشكل وثيق، إذ تؤدي الاستجابات المناعية المخاطية إلى إنتاج

الأضداد IgA المعادلة (Neutralizing) في الحيوانات لتتعامل مع إفرازات سلسلة الشريطية (Strobila) بحيث لايكون لها تأثير على الرؤيسات. تقوم الرؤيسات بالصيانة بشكل ممتاز عن طريق كبت الفعاليّة الخلوية المسممة للخلايا والمحفزة في ناحية الرؤيسات (Suppression and effector cell activiting) وذلك عندما تكون بتماس قوي مع الدورة الجهازية و لطخ باير (Peyers patches).

أظهرت التجارب بأن الدودة تنمو في الهمستر الذهبي المكبوت مناعياً والمخموج بالمشوكة متعددة الحجرات بشكل أسرع منها في الحيوانات الطبيعية غير المكبوتة (Kamiya و Sato، 1990). إضافة إلى ذلك، يتطور عدد كبير من ديدان المشوكة الحبيبية في الكلاب المكبوتة مناعياً أكثر من الكلاب غير المعالجة أو غير المكبوتة مناعياً، إذ يمكن أن يكون لدى الثوي النهائي بعض المقاومة الأولية للخمج بالديدان الناضجة. وقد أنتجت خلايا لطخ باير عند الكلاب المخموجة بالمشوكة الحبيبية غلوبولينات مناعية نوعية في الزجاج في المختبر (DepAlazes وزملاؤه، b1994). يثبط الخمج أو ينقص مقدرة الخلايا غير المحفزة على التكاثر في الاستجابات لبروتينات السائل العُداري لكنها تعزز استجابة كونكانافالين A (Concanavalin A) Con A. يتشكل لدى الكلاب المحقونة بالكونكانافالين A (Con) أو الميتوجينات الأخرى (Mitogen) و phytohemagglutinin عدد قليل من الديدان الناضجة أكثر من الكلاب غير المحقونة والتي لديها فعالية أقل. تزداد تراكيز الأضداد IgG و IgA في المصل بعد الخمج، كما تزداد الأضداد IgA في براز الكلاب، وتملك الكلاب التي لديها عيارات عالية من أضداد مستضدات السائل العُداري الكبدي حماية أفضل من الكلاب التي لديها عيارات منخفضة في المصل (Al-Khalidi و Barriga، 1986).

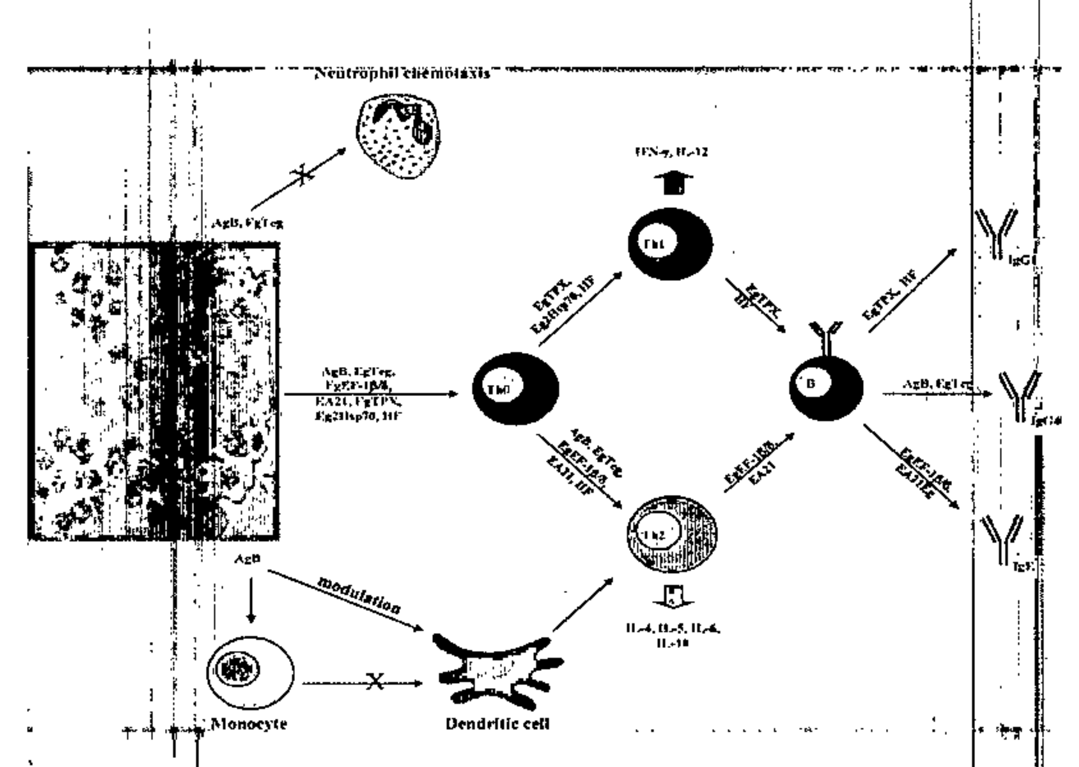
1-9 – دور الطفيليات في التعديل المناعي (immunomodulation):

يعرف مصطلح التعديل المناعي بأنه قدرة التغيير في جهاز المناعة في الجسم الناتج عن الوسائط التي تحفز أو تكبت وظيفتها. لسوء الحظ تمتلك الطفيليات تلك المقدرة التي تسبب هذا التغير في جهاز المناعة عند الإنسان أو الحيوان. يمكن أن تزال الأخماج الطفيلية في الأفراد الذين لديهم كفاءة مناعية كافية، حيث تنظم الطفيليات هبوط مناعة الثوي بهدف صيانة نفسها من الإزالة و التخلص منها من قبل جهاز مناعة الثوي. بالرغم من وجود نظرية قديمة تقول أن الطفيليات تشكل دوراً إيجابياً في التملص من المناعة، ومؤخراً تفترض الدراسات أن الطفيليات بشكل عام تتداخل بفاعلية مع استجابة مناعة الثوي (Harnett، 2005).

تشكل الطفيليات علاقة مع الأثوياء لتدعم فرصتها في البقاء على قيد الحياة، وبالتالي التكاثر والانتشار. إذ يوجد تفاعل ثابت يتضمن معدل انتشار عال في مجتمع الثوي والديمومة طول الحياة

مترافقة مع أعراض خفيفة. إن انجاز مثل هذا الهدف يحتاج لوقت كافي ليتكاثر الطفيلي ويغزو ثوي جديد، وإجبار الجهاز المناعي الجديد لتحريك وحشد جزيئاته لمقاومة وإزالة المسبب الخامج. إذ يمتلك الطفيلي استراتيجيات مختلفة لتتعامل مع تهديد جهاز مناعة الثوي (Siracusano، 2008).

غالباً ما يستخدم الطفيلي استراتيجيات فعالة لإنتاج بروتينات التعديل المناعي التي تغير من وظائف بروتين الثوي العادي ووظائف المناعة العامة. حيث تعيش الديدان متطفلة مدة طويلة في وسط غذائي يعود إلى الثوي. فمن أجل البقاء طورت الطفيليات استراتيجيات مختلفة بحيث تسمح لها بالتكاثر والدفاع عن نفسها ضد هجوم مناعة الثوي. تنغرس الطفيليات وتطور نفسها في داخل أنسجة الثوي، وتندمج مع الأيض الهضمي للثوي وتعدل استجابته المناعية، وتفرز بروتينات مرتبطة على الغشاء حيث تشارك في نطاق واسع وظائف الطفيلي. ويعد التعديل المناعي مساعدة الثوي للطفيلي، حيث تحمي الديدان من الاستئصال الجذري(الشكل6)، وفي الوقت نفسه تحمي الثوي من الاستجابات الالتهابية الشديدة التي تؤدي إلى ضرر العضو وإعطابه (Maizels و Yazdanbakhsh، 2003؛ Rosenzvit وزملاؤه، 2006).



الشكل6. التعديل المناعي الناجم عن المشوكة الحبيبية. وظيفة جزيئات الطفيليات في عدة مستويات للخلايا الناظمة للمناعة الحاسمة. المستضدات AgB, EgTeg and EgEF-1b/d يمكن أن تثير نشاط خلايا Th2 السائدة، حيث أن السائل العُداري يستطيع أن يثير مصاحبة نشاط Th1/Th2/Th0. (Siracusano وزملاؤه، 2008).

لقد تقدمت الآليات التي استخدمت لتوضيح الخمج المزمن للمشوكة الحبيبية بشكل ملحوظ من خلال توصيف جزيئات التنظيم المناعي التي تكبت وظيفة مجموعات الخلايا المناعية وتحضر مجتمعات الخلايا الأخرى المرتبطة بمرض المشوّكات الكيسيّة البشرية. وبهذا تمكنت الدراسات من تفسير الاستراتيجيات التي تستخدمها المشوكة الحبيبية لتبقى على قيد الحياة.

1-9-1- التفاعل مابين الطفيلي و الثوي:

تكون الصفة المميزة لعلاقة طفيلي- ثوي بأنه خمج مزمن يتواجد مع استجابات خلوية وخلطية قابلة للقياس ضد الطفيلي. تستخدم المشوكة الحبيبية آليتين لتعطل الاستجابة المناعية في الثوي هما الهروب من الجهاز المناعي والتعديل المناعي.

1-9-1-1- التملص من الجهاز المناعي (Evading the immune system)

يمكن أن تصل مدة حياة الكيسات العُدّارِيّة حتى 53 سنة في الإنسان (Spruance، 1974) و16 سنة في الخيول (Roneus وزملاؤه، 1982). هذا يعني أن الطفيلي يملك استراتيجيات جيدة للهروب وتجنب الاستجابات المناعية في الثوي. يوجد نوعين من الآليات المناعية هما: تخريب الاستجابات المناعية، والهروب الايجابي التي يتجنب من خلالها الطفيلي التأثيرات المناعية المخربة. وتكون العلامة الفارقة الملاحظة في الكيسات العُدّارِيّة هي تشكيل محفظتين أحدهما محفظة غشائية غير خلوية مشتقة من الكيسة والأخرى محفظة ليفية مشتقة من الثوي، حيث تحيط بالكيسات الحية المتطورة بشكل نموذجي، فمن المحتمل أنها تتشكل بوساطة ارتشاح الحمضات (Spruance، 1974) والفيبروبلاست (مولدات الليف) والخلايا الظهارية (Richards وزملاؤه، 1983). تقوم هذه البنى بحماية الطفيلي من العوامل الفيزيائية ومن هجوم الجهاز المناعي، إذ تضعف الاستجابة الأولية للثوي مع مرور الزمن بنحو 6 أشهر على الأقل بعد الخمج (Fotiadis وزملاؤه، 1999). ولايمكن أن يكشف عن الخلايا المفرزة لـ INF-γ وIL-2 و IL-4 في الآفات المرضي في المراحل المبكرة من الخمج (Bauder وزملاؤه، 1999)، وتشير إلى الكبت المناعي للثوي. كما أن نحو 30% من مرضى الكيسات العُدّارِيّة الحبيبية لديهم مستويات منخفضة من الأضداد في أمصالهم (Chemtai وزملاؤه، 1981؛ Craig وزملاؤه، 1996؛ Rigano وزملاؤه، 1998). وتحدث الحالة نفسها في الأخماج الغنمية (Judson وزملاؤه، 1985؛ Lightowlers وزملاؤه، 1986؛ Yong و Heath، 1979).

يمكن أن تزال المستضدات الطفيلية الجائلة في دم الثوي بوساطة الأضداد النوعية حيث أن كلا من المستضدات الجائلة والمعقدات النوعية قابلة للكشف في بعض الأشخاص الأسوياء السلبيين

للمرض (Craig، 1986). ومن الممكن أن يزداد المستضد المستحث للتحمل المناعي النوعي، فمن المتوقع أن ينتظم إنتاج الأضداد خلال فترة الخمج، وربما يكون ذلك من خلال طرح المستضد بشكل دوري من الكيسات و/أو نتيجة الانخفاض المنظم للخلايا البائية (B-cells) خلال نشاط الخلايا التائية Th-. لايعتمد الكبت المناعي الملحوظ في الإصابة المزمنة بالمشوكة الكيسية على السيتوكين IL-10 بل يعتمد على أوكسيد النتريت المنتج من قبل البالعات الكبيرة في الحيوانات المخموجة (Aminzhanov، 1980؛ Dai و Gottstein، 1999). وتسبب إفرازات الغدد المثقوبة للكرة المشوكة النشطة للمشوكة الحبيبية تحليل أنسجة الثوي، ويمكن أن تحمي هذه الإفرازات الطفيلي من الاستجابات المناعية إلى أن يتشكل الغشاء الجليدي (Laminated layer).

1-9-1-2- التعديل المناعي: يتفاعل من خلالها الطفيلي بشكل فعال مع الجهاز المناعي للثوي بهدف التقليل من تأثير الاستجابات المناعية (Zhang وMcManus، 2003). وتطبق تفاعلات المناعة من قبل الثوي المتوسط والثوي النهائي (Conchedda وزملاؤه، 2004؛ Zhang و McManus، 2006).

1-9-2- استجابة المناعة الخلطية للمشوكة الحبيبية:

تكون أصناف وتحت أصناف الأضداد حاسمة لأن لكل نمط متماثل (Isotype) وظائف بيولوجية واضحة، متضمنة الإنسمام الخلوي (Cytotoxicity)، والبلعمة (Phagocytosis) وتحرير وسائط إلتهابية (Mediators) (Ravetch و Bolland، 2001). ويمكن أن يتهرب الطفيلي من مناعة الثوي بإنتاج أضداد عائقة (Blocking antibodies). تكون تفاعلات فرط الحساسية المتواسطة بالضد IgE نادرة في مرضى الأخماج المزمنة، حيث تكون القعدات والخلايا البدينة في هؤلاء المرضى محسسة بالضد IgE بوجود مستضدات الطفيلي. ويحفز التفاعل التأقي في المصل أضداد عائقة في أخماج الديدان المزمنة، وقد وجدت بشكل سائد في الأضداد تحت الصف IgG4 (Vercelli وزملاؤه، 1998)، وذلك لأن IgG4 المترافقة بشكل طبيعي مع الأخماج المزمنة والطويلة تكون وحيدة التكافؤ وظائفياً (Monovalent)، وترتبط بشكل ضعيف مع مستقبلات FC للغلوبيلينات المناعية، حيث يمكن أن تساعد الطفيلي للتملص من الاستجابات المناعية (Garraud وزملاؤه، 2003)، مع أن المشوكة الحبيبية تحث على الاستجابات الخلطية بشكل قوي في الإنسان، إذ تحتوي أمصال المصابين بالمشوكة الكيسيّة على كمية وافرة من الأضداد الجائلة في الدم IgG، IgM، IgA، IgE المضادة للمستضدات العُذَارِيّة، ولا يترافق أي واحد من تلك الأضداد مع الحماية. بما أن الأضداد IgG النوعية يمكن تدوم في مصل المرضى لعدة سنوات بعد الشفاء، فان تحليل

استجابات الأضداد تحت صف IgG تثبت التشخيص الإكلينيكي، وقد برهنت بشكل كبير فائدتها في مراقبة ومتابعة المرضى، حيث أن الأضداد من الأنماط السوية تختلف خلال فترة المرض، إذ أوضحت الدراسات تشكل زيادة واضحة لكل من تحت الصف IgG1 وIgG4 في داء المشوّكات الكيسيّة (Aceti وزملاؤه، 1993؛ Wen و Craig؛ 1994). فكلما تقدم المرض بالمشوّكات الكيسيّة كلما كانت هناك سيادة لاستجابة IgG1 على IgG4 (Shambesh وزملاؤه، 1997).

تتشكل لدى المرضى الذين تمت معالجتهم بالبندازول وأبدوا استجابة جيدة للمعالجة الكيميائية مستويات منخفضة من الأضداد IgG4 أكثر من المرضى الذين استجابوا بشكل ضعيف أو الذين لم يستجيبوا، في حين أظهرت مستويات الأضداد IgG1 اتجاهاً معاكساً (Rigano وزملاؤه، a1995،b). وقد لوحظ وجود ارتباط بين استجابات الأضداد تحت صف IgG وعلاقة طفيلي- ثوي وآليات الهروب المناعي.

1-9-3- الاستجابة المناعية الخلوية للمشوكة الحبيبية:

لقد أنتجت معظم خلايا PMBC من مرضى المشوّكات الكيسيّة كمية وافرة من السيتوكينات IL-4 وIL-5 وIL-6 و IL-10 و IFN-γ. تنظم الاستجابة المناعية البشرية لخمج المشوّكات الحبيبية بوساطة فعالية خلايا Th2 وأيضاً بوساطة تحت مجموعة الخلايا Th1. وقد تم إثبات إنتاج سيتوكينات خلايا Th2 لاسيّما IL-5 وIL-10 (Fauser و Kern، 1997).

لقد حصل Siracusano وزملاؤه (2008) على دليل مؤكد بأن السيتوكينات لها دوراً هاماً في علاقة ثوي-طفيلي. إذ أنتجت خلايا PMBC في المرضى الذين استجابوا للمعالجة الكيميائية كميات عالية من IFN-γ، وبما أن خلايا المرضى PMBC الذين لم يستجيبوا أنتجوا السيتوكين IL-4 و IL-10، وتم إثبات ذلك من خلال الدراسة الجزيئيّة بالكشف عن IL-4 P40mRNA على وجه الحصر غالباً في المرضى المعالجين بنجاح (86%) في نهاية المعالجة الكيميائية، فقد عبرت IL-4 mRNA بشكل ضعيف قبل المعالجة وازدادت لاحقاً خاصة في خلايا المرضى PMBC الذين فشلوا في العلاج وازداد تعبير IFN-γ وTNF-α mRNA في المرضى الذين استجابوا للمعالجة ونقصت في الذين لم يستجيبوا (Rigano وزملاؤه ، 1999).

1-9-4- دور الخلايا اللمفاوية التائية في الاستجابات المناعية للمشوكة الحبيبية:

لقد تم تشكيل خطوط نسلية من الخلايا تائية من مرضى الكيسات العدارية الحية والميتة والمحفزة بمستضدات الطفيلي. فقد تشكل الخط النسلي نمط Th1 في مرضى الكيسات العُدَاريّة الميتة، بينما تشكل خليط من نسيلات Th1 وTh2 و Th0 في مرضى الكيسات العدارية الانتكاسي والحية

(Rigano وزملاؤه، 2004). وتشير تلك الدلائل على أنه في داء المشوكات الكيسيّة توجد استجابة قوية من Th2 بالارتباط مع الكيسات الحية، بينما كانت ترتبط استجابة Th1 مع المناعة الواقية (الكيسات الميتة، Inactive cysts) وتشارك استجابات Th1 و Th2(Siracusano، 2008). وتدل تلك الاختلافات على أن الأمصال السلبية تحدث بسبب عوامل الثوي أو الطفيلي أو كليهما معا إذ تمنعان فعالية خلايا Th2 وبالتالي إنتاج محدود من سيتوكينات Th2 لاسيّما IL-5 الأكثر أهمية والذي يشكل دوراً أساسياً في تعبير الغلوبيلينات المناعية(Siracusano، 2008).

1-9-5- المستضد AgB والتعديل المناعي:

أوضحت الدراسات الجزيئيّة أن المستضد AgB يشفر بعائلة متعددة الجين والتي لديها على الأقل 5 مواضع جينية (B1 إلى B5)، حتى أن كل واحد يتألف من عدة مواضع فرعية ثانوية (Arend و زملاؤه، 2004؛ Chemale وزملاؤه، 2001؛ Haag وزملاؤه، 2004؛ Kamenetzky وزملاؤه، 2005).

لقد قسمت في علم الباثولوجيا إلى قطاعين: EgAgB1/B3/B5 و EgAgB2/B4 (Muzulin و وزملاؤه، 2007). لقد فشلت العديد من التحاليل الباثولوجيا في التمييز بين الأنماط السوية EgAgB3 و EgAgB5 (Haag وزملاؤه، 2006). لقد شفّر الشكل السوي للبروتين الافتراضي بوساطة جينات EgAgB الخمسة، حيث تختلف في تتابع الحمض الأميني (44-81%). والتحول من أحد الأشكال السوية إلى آخر يفترض أن تكون كآلية جديدة تعمل على تجنب استجابة مناعة الثوي (Haag وزملاؤه، 2004). توحي وفرة المستضد AgB في الكيسات العُدَارِيّة بأن له دوراً حيوياً هاماً في أخماج المشوكة الحبيبية، فمن المحتمل أن يستخدم في تعديل استجابة الثوي الفطرية والتكيفية، حيث تعمل تحت الوحدة 12 كيلودالتون في المستضد AgB كمثبط للبروتياز الذي يمكن أن يثبط استخدام العدلات، حيث اقترح Shepherd وزملاؤه (1991) أن لهذا المستضد دوراً أساسياً في آليات هروب الطفيلي من المناعة الطبيعية المبكرة، وبالتوافق مع دور التعديل المناعي السلبي. تتجنب الآلية المتواسطة بالمستضد AgB من استجابة مناعة الثوي، وتلف أو انسكاب محتويات الكيسات العُدَارِيّة الخصبة (Virginio وزملاؤه، 2007). يشكل المستضد AgB دوراً هاماً في علاقة ثوي-طفيلي إذ يضعف الاستجابات الالتهابية، ويؤثر على توازن Th1/Th2 باتجاه استقطاب الخلايا Th2. وبذلك يسمح للعلاقة ثوي-طفيلي بالبقاء على قيد الحياة ويتطور خلال مدة طويلة من الزمن (Rigano وزملاؤه، 2004، 2001؛ Siracusano، 2008).

إن استقطاب الخلايا Th2 أكثر وضوحاً في مرضى الكيسات العُدّاريّة الحية (Active)، المحفز بالمستضد AgB، وازداد اللاتوازن الملاحظ بين القطاعات من مرضى الكيسات غير الفعالة (الميتة). يمكن أن تتمايز سليفة البالعات والوحيدات إلى خلايا مغصنة، إذ يمكن أن تشكل دوراً أساسياً في المناعة الفطرية والمناعة التكيفية. وتظهر الوحيدات تنوع وظيفي ملحوظ، حيث تسمح لها بأن تنجز وظائف دفاعية متعددة مثل إزالة المسبب المرضي بالبلعمة، وتنتج استجابات خلايا تائية نوعية للمستضد. وتتمايز خلايا Th2 بشكل سائد عند الخمج بالديدان (Siracusano، 2008).

يعد Kanan و Chain(2006) أول من لاحظا بأن السائل العُداري للمشوكة الحبيبية يعدل تمايز الخلايا المغصنة وإفراز السيتوكين. كما تم التقصي عن تأثير بروتينات السائل العُداري والمستضد AgB المنقى على تمايز الخلايا المغصنة انطلاقا من طلائع وحيدة النواة للثوي، وكيف تمنعان نضوج الخلايا المغصنة الجاهزة للتمايز(Rigano وزملاؤه، 2007).

أوضحت نتائج تلك الدراسات أن المستضد AgB يعمل على التملص من استجابات مناعة الثوي من خلال التدخل في وظائف الخلايا المغصنة للثوي في إستراتيجيتين، الأولى: من خلال إضعافها لتمايز طلائع الخلايا وحيدة النواة إلى خلايا مغصنة غير ناضجة، وجعلها غير قادرة على النضوج.

والثانية: يعتقد بأن تمايز الوحيدات المكبوتة يمكن أن تكون لوحدها كافية لتمنع أو تضعف استجابة مناعة الثوي، ويعدل المستضد AgB نضوج الخلايا المغصنة، وبشكل أولي يستقطب الخلايا اللمفاوية إلى الخلايا Th2 التي تفيد الطفيلي (تعبير IL-4). بالمقارنة مع المستضد AgB، السائل العُداري، الخليط الذي يحتوي العديد من المركبات المنحلة المختلفة، الخلايا المغصنة الناضجة وبالتالي استقطاب استجابات الخلايا Th2 السائد مع استجابة Th1. وهذه تؤكد الملاحظات في الزجاج في المختبر في مرضى المشوّكات الكيسيّة التي أظهرت أن المستضد AgB يستغل نِشاط الخلايا -th بوساطة تحريض إنتاج سيتوكينات Th2، بينما يحرض السائل العُداري توازن Th1/Th2/Th0 المسيطر بوساطة خلايا Th2 (Rigano وزملاؤه، 2001). قاد المستضد AgB إنتاج سيتوكينات Th2 في المختبر بشكل مماثل في الحيوان ليرفع من IgE النوعي و IgG4 لترتبط مع المستضد AgB. ويرتبط IgG4 بقوة مع تحت الوحدة 8 كيلودالتون للمستضد AgB (Wen و Craig، 1994؛ Rigano وزملاؤه، 1995a،b؛ Ippolo وزملاؤه، 1996؛ Rigano وزملاؤه، 2002).

لقد العديد من الدراسات بأن المستضد AgB هي جزيئة معدلة مناعية بشكل مباشر لاستجابة مناعة الثوي من خلال منع الانجذاب الكيميائي للخلايا متعددة النوى (Poly morpho nucleo cytes) وبشكل غير مباشر بالسعي لتعديل نسبة سيتوكينات Th1:Th2 باتجاه Th2 بالترافق مع مرضى المشوّكات الكيسيّة المزمن.

1-9-6 الجزيئات المعدلة مناعياً الأخرى:

نتيجة للتقدم السريع في تقانات البيولوجيا الجزيئيّة ازدادت المعرفة حول التشخيص المناعي وعلاقة ثوي–طفيلي (Siles-lucas وGottestein، 2001؛ Siracusano وزملاؤه، 2002). وقد سمحت الإستراتيجيات الجزيئيّة في عزل جزيئات مضادة وراثية للمشوكة الحبيبية. ونحو 20% من مرضى المشوّكات الكيسيّة لديهم تفاعلات تحسسية متضمنة الأرتيكاريا (الشرى)، الوذمة، أعراض تنفسية، صدمة تأقية ناتجة عن التمزق التلقائي أو المحرض لكيسات الطفيلي. وقد تم التعرف على ثلاثة بروتينات تركيبية EgEF-1B/8، EA21، Eg2Hsp70 (Margutti وزملاؤه، 1999؛ Ortona وزملاؤه، 2001، 2002، 2003).

عند الكشف عن وجود المعينات المستضدية للبروتين EF-1B/8 ظهرت الأضداد IgE في مرضى الاضطرابات التنفسية وأخماج الطفيليات والحساسية. كما وجد بأن الاستجابة المناعية الخلطية ضد EgEF-1B/8 في مرضى الكيسات الميتة كانت أكثر مما هي عليه في مرضى الكيسات الحية (Ortona و زملاؤه، 2001). اشارة إلى تلك الاختلافات يستمر تحرر البروتين EgEF-1B/8 في السائل العُداري بعد تنكس الرؤيسات الأولية، اشارة إلى أنه يتداخل مع التعديل المناعي. وإضافة إلى ذلك يوجد دليل آخر هام وهو وجود نسب عالية من أمصال المرضى المصابين بالمشوّكات الكيسيّة بدون ظواهر أليرجية لديها IgG2 النوعي لـ EA21 (Ortona وزملاؤه، 2002)، وهذا الدليل يؤكد على أنه تتشارك جزيئتين غلوبلين مناعي متغايريتن بين الضد IgE النوعي لـ EA21 والحماية ضد التفاعلات الأليرجية من جهة، وبين IgE النوعي لـEA21 والظواهر الأليرجية من جهة أخرى. لهذا السبب يعمل الضد IgG4 بشكل واضح على منع العمليات الإمراضية في داء المشوّكات الكيسيّة كما في الطفيليات الأخرى.

لقد أظهرت إحدى الدراسات وجود تشارك بين التفاعلات الأليرجية والضد IgE النوعي لـ EgEF-1B/8 و EA21 في مرضى المشوّكات الكيسيّة، لكن لايوجد تشارك عند استعمال المستضد Eg2Hsp70 (Ortona وزملاؤه، 2003). وقد يكون السبب هو أن المستضد Eg2Hsp70 ناقص في المعينات المستضدية المعينة المتعددة التي تحتاج لإثارة التفاعلات الأليرجية. ليس فقط المستضد Eg2Hsp70 يحث على الاستجابات المناعية الخلطية، وأيضاً الاستجابة المتواسطة بالخلايا. حث المستضد Eg2Hsp70 في خلايا PBMC مرضى المشوّكات الكيسيّة على إنتاج كميات كبيرة بشكل واضح من TNF-α و IFN-γ و IL-10 أكثر من PBMC في المزارع غير المحفزة. يستحث المستضد Eg2Hsp70 على إنتاج كميات كبيرة من السيتوكين IL-4 بشكل خاص في خلايا PBMC المرضى بتفاعلات أليرجية. من المحتمل أن يتزامن مع استثارات الخلايا Th1 لإفراز

TNF-α وIFN-γ وخلايا Th2 لإفراز IL-10 و IL-4. ولأن هذا المستضد يعبر المعينات المستضدية لكل زمرة من الخلايا التائية (T-Cell) (Rogan وزملاؤه، 2006).

1-10 - التحصين ضد المشوكات:

تتضمن دورة حياة المشوكة ثويين هما: الثوي المتوسط والثوي النهائي. ينفذ برنامج التحكم والسيطرة بالمشوكة الكيسيّة الفعالة تجاه ذراري المشوكة الحبيبية الجغرافية المختلفة (Lightowlers وزملاؤه، 1999)، ويمكن أن تكون أداة جديدة للتحكم بداء الكيسات العُدَاريّة قابلة للتطبيق بشكل واسع في حملات السيطرة على المشوكات. وتعد اللقاحات وسيلة قيمة تساعد في السيطرة على المرض، حيث تقلل من الخمج بالمرض العُداري بشكل مباشر من خلال تحصين البشر. كما يمكن أن تقلل أو حتى تستأصل الخمج في المجتمعات البشرية أو الحيوانية. لذلك يمكن أن تحصن كلا الثوين الإنسان والحيوان، ويعد استخدامه أكثر سهولة في السيطرة على المرض (Heath وزملاؤه، 1994). وتعد طريقة التحصين غير مرغوبة لمكافحة المشوكة متعددة الحجرات في دورة الحيوانات البرية (Sylvatic life cycle).

1-10-1- تحصين الأثوياء المتوسطة:

تطور تحصين الثوي المتوسط بشكل جيد في السنوات الأخيرة باتجاه مواكبة تطوير اللقاح المتأشب ضد خمج الاغنام الكيسة المذنبة الغنمية (Lightowlers وزملاؤه، 2000). وبطريقة مشابهة تم بنجاح تطوير لقاح متأشب ضد المشوكة الحبيبية (Lightowlers وزملاؤه، 2000، 1996). وقد استخدم بشكل مبكر طيف واسع من المستضدات المختلفة كمستضدات رئيسية ملائمة لتحريض استجابة مناعية ضد المشوكة الحبيبية تضمنت السائل العُداري (Pauluzzi و Rosa، 1969؛ De Rycke و Pennoit-De Cooman، 1973؛ De Rosa وزملاؤه، 1977؛ Dada و Belino، 1981؛ Heath وزملاؤه، 1992) والأغشيّة الكيسيّة (Pauluzzi و Rosa، 1969)، والرؤيسات الأولية (De Rycke و Pennoit-De Cooman، 1973؛ Hernandez و Nieto، 1994؛ Turner وزملاؤه، 1937)، وتنتج الكرات المشوكة (Oncospheres) أو مستضدات الكرات المشوكة مستوى عالي من الحماية في الأغنام (Gemmell، 1966؛ Heath وزملاؤه، 1981؛ Osborn و Heath، 1982؛ Heath و Lawrence، 1996) والفئران (Dempster وزملاؤه، 1991؛ Zhang وزملاؤه، 2001). وقد عزل الجزيء 25 كيلو دالتون من المستخلص الخام لمستضدات الكرة المشوكة بوساطة الرحلان الكهربائي (SDS-PAGE)، وقد أظهرت أيضاً تحفيزاً لمستويات مشابهة من المقاومة (Heath و Lawrence، 1996). استعمل Lightowlers

وزملاؤه (1996) الأضداد المحضرة ضد هذه الجزيئة من مكتبة cDNA المكملة المحضرة من الكرات المشوكة و كلونات cDNA المكملة المختارة إذ تم تعبيرها جينياً في الايشريشاكولي كبروتين منصهر مع غلوتايون S ترانس فيريز (GST) حيث فحصت كفاءة الحماية في الأغنام المحصنة بإجراء اختبار التحدي ببيوض المشوكة الحبيبية (Lightowlers وزملاؤه، 1996). كما أثارت الجزيئة 16.5 كيلودالتون البروتين المتأشب (EG95). إذ أن 50 مكغ من البروتين المنصهر GST المتشكل في مساعد الزيت أو في الصابونيين شكلت حماية واضحة متوسطها 60-98% ضد تطور الكيسات العُدَارِيّة (Lightowlers وزملاؤه، 1996 و 2000). عند حقن الحيوان بجرعتين من اللقاح يمنحه مناعة (متواسطة بالأضداد المثبتة للمتممة) تدوم نحو 12 شهر على الأقل (Heath و Holcman، 1997). لذلك ينصح بالتحصين السنوي للحيوانات المستأنسة (Lightowlers وزملاؤه، 1996؛ Heath و Holcman، 1997)، ويقدر نصف عمر اللقاح المتشكل بنحو 12 شهر على الأقل. ويمكن أن ينتج عيار واحد من مزرعة الايشريكية القولونية أكثر من 10000 جرعة، أي أنه بالإمكان تصنيع اللقاح بشكل رخيص. وبشكل آخر يمكن أن تنتقل الأضداد بشكل ايجابي إلى المواليد من الأمات المحصنة بلقاح EG95 (Heath وHolcman، 1997). وتترافق الحماية المتشكلة مع المحددات المستضدية المتطابقة (Woollard وزملاؤه، 1998، 2000). ويمنح اللقاح درجة عالية من الحماية ضد الإصابة بالعترات الجغرافية المختلفة للمشوكة الحبيبية (Lightowlers وزملاؤه، 1999)، لذلك يمكن أن يكون لها تطبيقات واسعة كوسيلة جديدة للتحكم في داء الكيسات العُدَارِيّة، وتساعد في السيطرة عليه عند الإنسان. وقد أشارت البحوث الحديثة أن الجين الناسخ EG95 ينتمي إلى عائلة جينية مكونة من ست جينات أو أكثر (Chow وزملاؤه، 2001)، كما يمكن نسخ بروتين يسمى EM95، يحث على تشكيل مستويات عالية من الحماية ضد الخمج بالمشوكة المتعددة الحجرات في الفئران (Gauci وزملاؤه، 2002).

1-10-2- التحصين في الثوي النهائي:

مقارنة مع التقدم المنجز في الأغنام المحصنة ضد المشوكة الحبيبية، فقد أجريت محاولات لتحصين الأثوياء النهائية من العائلة الكلبية بشكل مشابه بمستويات عالية من النجاح. مع أنه تم الحصول على نتائج مشجعة عند تحصين الكلاب، فقد استخدمت الرؤيسات الأولية المشععة للمشوكة الحبيبية في تجارب التحصين حيث سببت تثبيط نمو الديدان في الأمعاء الدقيقة عند الكلاب (Movsesijan وزملاؤه، 1968؛ Movsesijan و Mladenovic، 1970؛ Aminzhanov، 1980). يمكن أن تحفز الرؤيسات الأولية أو مستضدات الرؤيسات الأولية على تقليل أو كبت نمو الديدان في الكلاب

(Turner وزملاؤه، 1933، 1936؛ Gemmell، 1962؛ Zhang وزملاؤه، 1999). ويمكن الحصول على الحماية من مصادر المستضدات الأخرى مثل السائل العُداري (Aminzhanov، 1980) وأغشيّة الكيسة العدارية (Gill، 1969؛ Turner وزملاؤه، 1936) ومستخلصات الدودة الناضجة (Turner وزملاؤه، 1936؛ Gemmell، 1962) ومفرزات الدودة (Ioppolo وزملاؤه، 1996؛ Herd وزملاؤه، 1975). كما يوجد بعض الأدلة على تطور المناعة المكتسبة للمشوكة متعددة المساكن في الثعالب.

1-11 - تشخيص المشوكات:

يمكن أن يشكل التشخيص المبكر للمشوكة الكيسيّة والمشوكة السنخية تحسينات في نوعية إدارة ومعالجة كلا المرضين. وفي معظم الحالات، تمر مراحل الخمج المبكرة بدون أعراض، لذلك يعد توافر طرائق تشخيصية رخيصة وسهلة الاستخدام نسبياً أمراً مطلوباً لإجراء مسح المجتمعات التي لديها معدل خطورة عالي.

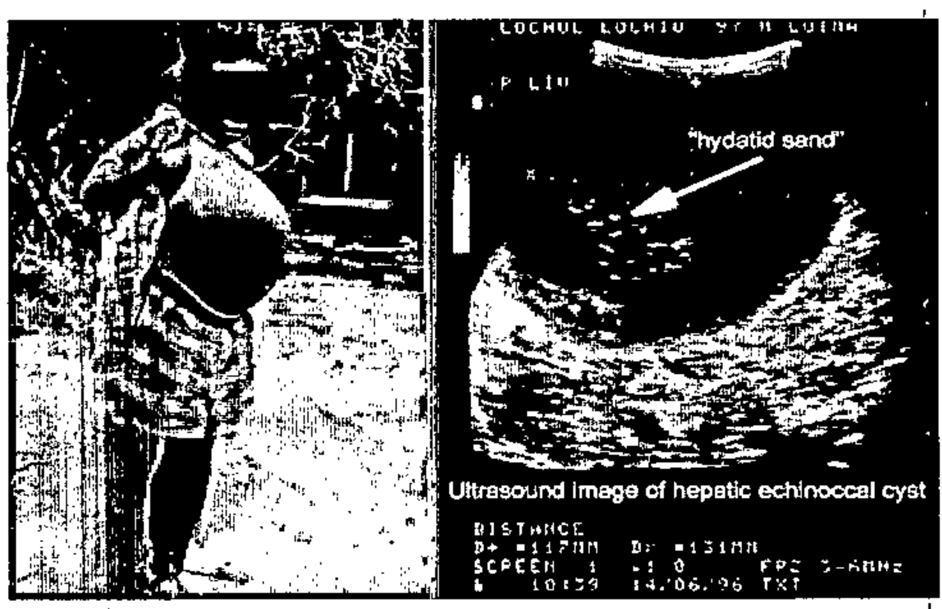
تنفذ طريقة التشخيص المناعي بهدف إثبات المرض إكلينيكياً. فقد شخص كل من Schantz و Gottstein (1986)، Rickard و Lightowlers (1986)، Lightowlers وGottestein (1995)، و Gottstein (b1992) المرض العُداري بشكل مبكر مصلياً. وتم تطوير تطبيقات التشخيص المناعي لخمج المشوّكات في الأثوياء المتوسطة (الإنسان والحيوان) وفي الأثوياء النهائية (Pawlowski وزملاؤه، 2001). وقد تحسنت في العقود الأخيرة طرائق تشخيص المشوّكات الكيسية والمشوّكات السنخية، حيث استخدمت طرائق جديدة أكثر فعالية لتنقية مستضدات المشوّكات من المواد الجسمية باستخدام تطبيقات البيولوجية الجزيئيّة أو التقانة الحيوية لتحديد الطفيلي عن طريق تركيب مستضدات تشخيصية متأشبة وببتيدات مولدة للمناعة. فقد حسنت هذه الطرائق ليس فقط الحساسية والنوعية للاختبار فحسب، بل سمحت لمزيد من الموثوقية الحيوية للمواد الطفيلية (Thompson و McManus، 2001؛ Siles-Lucas و Gottstein، 2001).

1-11-1- تشخيص المشوكات الكيسيّة في الإنسان:

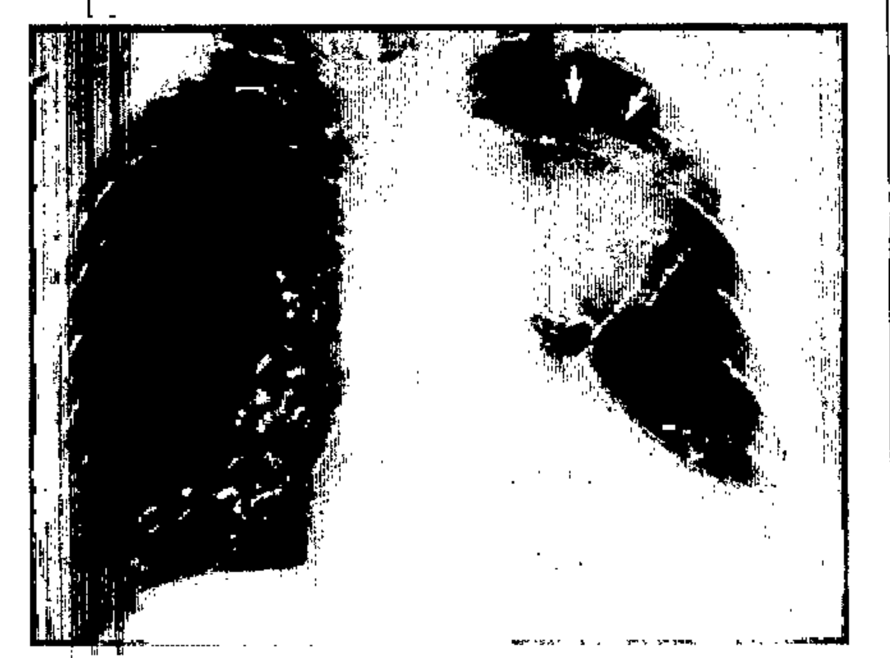
1-11-1-1- طريقة التصوير الطبوغرافي:

توجد عدة طرائق لتشخيص داء الكيسات العُدَارِيّة عند الانسان، حيث يستخدم التصوير بالأمواج فوق الصوتية (الشكل7)، والتصوير الشعاعي (الشكل8)، والمرنان، والتصوير الطبقي

المحوري (Lightowlers وزملاؤه، 1984؛ Von Sinner ، 1991؛ Lightowlers وزمـــلاؤه، 2000).



الشكل7. توسع في البطن عند طفل نتيجة الإصابة بداء المشوّكات الكيسيّة في الكبد، ويبدو ذلك واضحاً في صورة الأمواج فوق الصوتية (Moro و Schantz، 2008).



الشكل8. تشخيص الكيسات العدارية الرئوية للمشوكات الحبيبية باستعمال التصوير الشعاعي (Schmitt وزملاؤه، 1997).

1-11-1-2- التشخيص المناعي للمشوكات الكيسيّة:

لاتكون طرائق التصوير الفوتوغرافي متوافرة في كثير من الأحيان، لذلك كان البحث عن طرائق مناعية سهلة الاستعمال لتأكيد الإصابة ومراقبة المعالجة الكيمائية بعد الاستئصال الجراحي ضرورياً.

يعد اختبار تثبيت المتممة (Complement Fixation Test) أول الاختبارات المناعية التي استخدمت في الكشف عن أضداد داء الكيسات العُدَاريّة، ثم طورت بعدها العديد من الاختبارات المصلية مثل اختبار التراص الدموي غير المباشر(IHA) ، واختبار الانتشار المناعي المضاعف، واختبار الومضان المناعي غير المباشر(IFT) ، والرحلان الكهربائي المناعي(IE) ، والمقايسة المناعية الإشعاعية (RIA)، والرحلان الكهربائي المناعي التقابلي Counter- current immuno) (electrophoresis, CIEP، والمقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم (ELISA). (Zarzosa وزملاؤه، 1999؛ Ortona وزملاؤه، 2000). وتشخص الإصابة عند الإنسان، باستعمال أشعة X والتصوير الطبقي المحوري، والتصوير بالأمواج فوق الصوتية، وتؤكد التشخيص أوينفى بالاختبارات المصلية مثل تقنية المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم والتبصيم المناعي (Eckert و Deplazes، 2004).

وتبقى حساسية ونوعية كثير من هذه الاختبارات مع ذلك منخفضة، كما أنها قد تبدي تفاعلات ايجابية كاذبة. ولقد حصل Siavashi وزملاؤه (2005) على حساسية ونوعية عاليتين عندما استعمل تقنية المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم الشطائرية (Sandwich Elisa)، إذ بلغت نحو 93.22%، 98.75% على التوالي، وذلك باستخدام مستضدات الكيسات العُدَاريّة الكبديّة والرئوية الغنمية. غير أنهم سجلوا تفاعلات تصالبية مع المتورقة الكبديّة في كلا التبصيم المناعي النقطي والمقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم الشطائرية باستعمال المستضدات من كيسات الكبد والرئتين والأغنام مع أمصال بشرية. كما سجلت أيضاً تفاعلات تصالبية مع مرضى داء الكيسات المذنبة والفيلاريا والسهمية، وداء هجرة اليرقات الحشوي والتليف الكبدي بوساطة الاليزا النقطية باستعمال المستضد الخام من السائل العُداري عند الأغنام (Swarna وParija، 2008). وقد أشارت رمضان (1992) بأن المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم الشطائرية تقلل من التفاعلات التصالبيّة مقارنة بالمقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم البسيطة غير المباشرة وذلك عندما يتراوح تركيز المستضد بين 125 و 500 نانوغرام. أما في اختبار التبصيم المناعي النقطي (Dot-blot) فقد بلغت الحساسية والنوعية 100% و 98.75% على التوالي باستعمال المستضد B. في حين بلغت الحساسية 96.66%، 86.66%، 93.33% في الغشاء الجليدي، والرؤيسات والسائل العُداري على التوالي، إذ استعملت كمصدر آخر للمستضدات العُدَاريّة، وبلغت النوعية حوالى 70% لكل المستضدات (Swarna وParija، 2008)، علماً أن الغشاء الجليدي

يحتوي على مستضدات مشتقة من الطفيلي، وأخرى مشتقة من الثوي نفسه، وكانت الجزيئات الأكثر استضداديّة متركزة في المنطقتين الموافقتين للكتل الجزيئيّة النسبية 50- 66 و 25- 29 كيلودالتون(Taherkhani، 2001). وفي دراسة أخرى اعتمد على اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم باستعمال المستضد B المستخلص من سائل الكيسات العُدَاريّة الغنميّة، في تأكيد التشخيص الإكلينيكي في المختبرات وأيضاً في المسوحات المصليّة، وذلك بوضع ميكروغرام واحد في كلّ حفرة، وبفترة تحضين 45 دقيقة وتمديد المصل 1:800، وقد تفاعلت واحدة من أصل 12 حالة تصالبياً مع المتورقة الكبديّة في هذا الاختبار، بينما لم تتفاعل تصالبياً مع المتحولات والليشمانيا والسهمية والمقوسة القندية، ولم تتشكّل أية تفاعلات مع أمصال الأشخاص الصحيحين غير المصابين بالكيسات العُدَاريّة، حيث وصلت نسبة الحساسيّة إلى 97% والنوعيّة إلى 98.5% (Ramtin وزملاؤه، 2003).

أما Hadighi وزملاؤه (2003) فقد حصلوا على حساسية ونوعية عالية باستعمال المستضد Ag B الغنمي بتركيز 1 مكغ في كل نقطة في اختبار التبصيم المناعي النقطي للكشف عن أضداد الكيسات العُدَاريّة عند الإنسان، و بلغت الحساسية 97.1% والنوعية 98.5% بينما بلغت قيمة التنبؤ الايجابي(PPV) نحو 97.1% وقيمة التنبؤ السالب(NPV) نحو98.5%، غير أن هنالك حالة واحدة فقط تفاعلت مع المتورقة الكبديّة . ولقد قيّم Haniloo وزملاؤه (2005) المستضد B وحصلوا على حساسية بلغت 89% بتقنية المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم، و80% بالتبصيم المناعي لكلا المستضدين 16 و 12/8 كيلو دالتون في حين كانت النوعية نحو 98% في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم و100% في التبصيم المناعي لكلا العصابتين. أما في حالة المستضد الخام للسائل العُداري فكانت الحساسية والنوعية 94%، و83% على التوالي، كما سجلوا تفاعلات تصالبية مع الوحدات 27 و24 في حين تفاعلت تحت الوحدة 38 مع السهمية.

قيمت Sabry (2007) الجزيئات 8-12 كيلودالتون، 16-18 كيلودالتون و32-38 كيلودالتون في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم، التي حصلت عليها من فصل السائل العُداري الرئوي الجملي، فكانت الجزيئة 8-12 كيلودالتون هي الأكثر نوعية (96.66%) فلم تسجل أية تفاعلات تصالبية مع أمصال المرضى بالممسودات وأيضاً الجمال المخموجة بالمتورقة الكبديّة والأغنام المخموجة بالمونيزية وبالمتورقة الكبديّة وبلغت حساسيتها نحو 100%. بينما كانت الكتل الجزيئة 32-38 كيلودالتون ذات نوعية أقل 93.33% لكنها كانت ذات حساسية مطلقة بلغت 100%، بينما أظهرت الجزيئة 16-18 نوعية منخفضة(81.66%) وحساسية جيدة (92%) وذلك عند تمديد المصل 1:100، وتمديد

الإنظيم 1:2000، وتركيز المستضد 2 مكغ/مل، وقد سجلت الجزيئة 16-18 تفاعلات تصالبية مع المونيزية اكسبانزا والمتورقة الكبديّة في حين لم تتفاعل الجزيئة 32-38 كيلودالتون مع المتورقة الكبديّة .

كشف الياسين(2006) عن أضداد الكيسات العُدَارِيّة في الأغنام باختبار الانتشار المناعي المضاعف وبحساسية 88.88% ونوعية 93.88% لكنها أبدت تفاعلات تصالبية مع الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة بنسبة 14.28%. قيم Rokni و Aminian (2006) صلاحية تقنية EITB (Enzyme-linked Immuno-electro Transfer Blot technique) في تشخيص الكيسات العُدَارِيّة عند البشر باستعمال مستضدات السائل العُداري الغنمي فقد سجلا حساسية ونوعية جيدة وقيمتي التنبؤ السلبي والايجابي للمستضد AgB والمستضد Ag5 فكانت قيمها 95%، 88.5%، 86.4%، 95.5%، 97.3%، 64.8%، 60.3%، 97.7% على التوالي. كما سجل تفاعلات تصالبية مع أمصال الأشخاص المصابين بالمتورقة الكبديّة والسهمية وداء الأسطوانيات وداء الأسطوانيات الشعرية ومع الناس الصحيحين.

تشخص معظم حالات البشر المصابين بداء المشوّكات الكيسيّة بوساطة طرائق التصوير الفيزيائية مثل الأشعة، الأمواج فوق الصوتية، الطبقي المحوري، المرنان (Lightowlers و Gottstein، 1995) غير أن هذه الإجراءات غالباً ما تكون ليست متوافرة في المجتمعات النائية.

يشكل التشخيص المناعي دوراً هاماً مكملاً وداعماً، إذ يفيد في التشخيص الأولي وأيضاً في مراقبة المرضى بعد المعالجة الكيميائية أو الجراحية، ويعد الكشف عن المستضدات الجائلة في الأمصال أقل حساسية من الكشف عن الأضداد. الاختبار المصلي للكيسات العُدَارِيّة له تاريخ طويل جداً، فقد طورت معظم الاختبارات المصلية التي استخدمت في تشخيص الحالات البشرية.

يوجد اختلافات واضحة في نوعية وحساسية الاختبارات، فكلما استخدمت مستضدات محسنة كلما زادت حساسية الاختبار، لذلك يمكن أن تشكل النوعية الجيدة حساسية أكبر، متضمنة اختبار كازوني في الجلد، اختبار تثبيت المتممة، اختبار التراص الدموي غير المباشر، اختبار التراص لاتكس، وقد استبدلت باختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم (ELISA). واختبار التألق المناعي غير المباشر (The indirect Immuno Fluorescence Antibody test). كان Chordi و Kagan (1965) أول من درس الاستجابات الضدية في أخماج الكيسات العُدَارِيّة البشرية بوساطة الرحلان الكهربائي المناعي (Immunoelectrophoresis, IEP) مع أمصال بشرية ومستضدات السائل العُداري الغنمي. وقد أجريت دراسات مكثفة معمقة على مستضدات السائل العدارى التي مازال تعتبر مصدر قيم للمادة المستضدية في التشخيص المناعي. وقد تم تقييم الفعاليّة المناعية

للمستضدات مع أمصال المرضى بالكيسات العُدَارِيّة بهدف تطوير تقانات حديثة لتحضير مستضدات نقية (Williams وزملاؤه، 1971؛ Pozzuoli وزملاؤه، 1974، 1975؛ Piantelli وزملاؤه، 1977؛ Lauriola وزملاؤه، 1978؛ Musiani وزملاؤه، 1978).

إن تركيز البروتينات ذات الفاعليّة المستضديّة العالية في السائل العُداري الكبدي بلغت نحو 3.42 ملغ/مل أكثر منها في السائل العُداري الرئوي التي بلغت نحو 0.76 ملغ/مل (الياسين، 2006) ويحتوي سائل الكيسات العُدَارِيّة على نسبة عالية من البروتينات غير الهامة في التشخيص المناعي (Capron وزملاؤه، 1970) ويعود أكثر من نصفها إلى أصل الثوي نفسه (Gottstein، 1984) كما يشكل الضياع البروتيني في أثناء المراحل المختلفة لعمليّة الاستفراد نسبة معتبرة.

يعد مستحضر السائل العُداري البشري غير مناسب للتشخيص المناعي بسبب احتوائه على بروتينات الثوي مثل الأضداد IgG (Baveja وزملاؤه، 1997). وقد استعمل بشكل روتيني السائل العُداري الغنمي المجموع من كيسات خصبة لتحضير ومعايرة المستضد. إذ يمكن أن يستخدم السائل العُداري البقري كمصدر مستضدي بديل وقد حسن من حساسية التشخيص.

يستعمل السائل العُداري عند الإبل أيضاً كمستضد في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم لقياس الأضداد IgG النوعية الكلية للمشوكة الحبيبية وأيضاً تحت أصناف (IgG (Subclass (Ramzy وزملاؤه، 1999). وقد بلغت القيمة التشخيصية للضد IgG1 المقاسة (97.7%) بواسطة Rating index لربط الحساسية والنوعية. وكانت الأولى في استعمال IgG الكلي (65.1%) وIgG2 إلى IgG4 (77.8% ،57.9 % و 39.6%) على التوالي (Ramzy وزملاؤه، 1999). وقد وضعت هذه العلامات الخطة للتشخيص الحقلي لمقايسة IgG1 في المناطق الموبوءة بالمشوكات الكيسيّة عند الإنسان.

يعد المستضدان AgB و Ag5 مركبات ليبوبروتينة (Oriol و Oriol، 1975) وهي المركبات الرئيسية للسائل العُداري. وهما الأكثر شيوعاً في التشخيصات المناعية الحديثة للمشوكات الكيسيّة. وقد تم تحديد خصائصهما بوساطة التبصيم المناعي والترسيب المناعي للمستضد الموسوم إشعاعياً والفصل في هلامة عديد الأكريلاميد SDS-PAGE (Shepherd و McManus، 1987؛ Al-Yaman و Knobloch، 1989؛ Lightowlers وزملاؤه، 1989؛ Shapiro وزملاؤه، 1992).

المستضد AgB:

أول من تحدث عن المستضد AgB هو Oriol وزملاؤه (1971) وهو ليبوبروتين متعدد الجزيئات عالي الاستضدادية، الذي يتراوح وزنه الجزيئي بين 120 و160 كيلودالتون يتواجد في

سليفة الشريطية، وتم تنقيته في SDS-PAGE، ويتألف من وحدات 8 و16 و20 كيلودالتون (Oriol و Oriol، 1975، Ligthowlers وزملاؤه، 1989). ويمكن أن يقاس في دم المرضى كمستضـد جائل (Kanwar وزملاؤه، 1994، Liu وزملاؤه، 1993)، ويشكل دوراً هاماً في حيوية الطفيلـي وعلاقته مع الثوي (Shepherd وزملاؤه، 1991؛ Rigano وزملاؤه، 2001) .

يعد المستضد AgB جزيئة لها قدرة استضدادية عالية، إذ تحث المناعة بشكل كبير (Chordi و Kagan، 1965؛ Oriol وزملاؤه، 1971)، وتشكل لبنة أساسية من حيث قيمتها في التشخيص المصلي، وتبدو على شكل سلم في هلامة عديد الأكريلاميد في الشروط المخفضة، حيث تشكلت ثلاث عصائب كانت كتلها الجزيئية 8 أو 12، 16، 24 كيلو دالتون (Chordi و Kagan، 1965؛ Oriol وزملاؤه، 1971؛ Shepherd و McManus، 1987؛ Lightowlers وزملاؤه، 1989؛ Leggatt وزملاؤه، 1992) ويعتقد أنها جزيئة متعددة مؤلفة من الوحدات ذات الوزن 8 كيلودالتون (Lightowlers وزملاؤه، 1989، Gonzalez وزملاؤه، 1996). لقد برهن على الفائدة الكبيرة للجزيئة الأصغر في الدراسات التشخيصية (Rott وزملاؤه، 2000؛ Ortona وزملاؤه، 2000).

هناك العديد من مكتبات cDNAs المستضد AgB المكلونة (Cloned) التي تم التعبير (Expressing) عنها كبروتينات متأشبة، واستعملت في التشخيص. وإضافة إلى ذلك، فقد تم تركيب عدد من ببتيدات المستضد AgB واستعملت في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم لأغراض تشخيصية. وقد استخدمت المستضدات الببتيدية لزيادة قيمة النوعية، كما بذلت جهود لتحديد المواضع المستضدية (Epitopes) للمستضد AgB والجزيئات الأخرى التي يمكن أن تحاكى (Mimicked) بوساطة الببتيدات التركيبية. لقد عمل Zhang وزملاؤه (2000) و Shepherd وزملاؤه (1991) على استنساخ (Cloned) قطعة C-Terminal من مكتبة cDNA الرؤيسات الأولية وعبرت جينياً (Expressed)، مثل البروتين 12 كيلو دالتون (Shepherd وزملاؤه، 1991). اصطلح على التتابع (Sequences) الكامل اسم EgAgB8/1، ثم استنسخ فيما بعد (Frosch وزملاؤه، 1994)، غير أن استعمالها لأغراض تشخيصية غير واضح، وقد استعملت بشكل لاحق القطعة الأخرى المسماة EgAgB8/2 إذ كانت مقترحة لتشكل الوحدة 8 كيلو دالتون بنسبة تطابق 38% للنسيلة EgAgB8/1 (Fernandez وزملاؤه، 1996).

تعد الجزيئة EG55 نسيلة متأشبة أخرى أيضاً متطابقة مع الوحدة الأصغر للمستضد AgB وتم التعبير عنها كجزيئة منصهرة GST واختبرت في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم مضاعفة الساندوتش (Sandwich ELISA) من حيث قدرتها على كشف أضداد المصل النوعي في مرضى المشوكات الكيسيّة. تفاعل المستضد تصالبياً بشكل رئيسي مع أمصال مرضى المشوكات السنخية

بنسبة 39.2% (Helbig وزملاؤه، 1993). يطابق المستضد المتأشب 2-KDaEgPS-3 أيضاً الوحدة الأصغر للمستضد AgB، وقد فحص بشكلٍ مماثل في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم كبروتين منصهر في Gst لتشخيص المشوّكات الكيسيّة البشرية؛ إذ تم التعرف على البروتين عند 74% من المرضى، لكن مازال يوجد هناك تفاعلات تصالبية مع أمصال المرضى بداء المشوّكات السنخية، والمرضى بداء المنشقة اليابانية (Schistosoma Japonicum). كما أن المستضد P65 هو ببتيد مكون من 27 جزيئة مطابق لـــ resides 12 إلى 39 من المستضد AgB8/1، وقد أظهر زيادة في النوعية لكن نقصت الحساسية بشكل طفيف في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم (Leggatt و McManus، 1994). وقد بذلت الكثير من الجهود لتشخيص المشوّكات الكيسيّة. إذ قارن Barbieri وزملاؤه (1998) القيمة التشخيصية للمستضدات P65، G44، والببتيد المركب من 34 جزيئة المطابقة لنهاية C-Terminal للوحدة AgB8/2 مع المستضد P89-122 الذي هو ببتيد تركيبي مشتق من المستضد Ag5. فقد أثبت بأن حساسية الببتيد P65 أعلى ثلاثة إلى أربعة أضعاف، لكنه أخفض بنسبة 30% في النوعية أكثر من الببتيدين الآخرين. كما أظهرت الدراسات بأن الناحية المستضدية بشكل عالي في AgB resides في التوسع N-Terminal extention للوحدة AgB8/1؛ في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم باستعمال ببتيد مفرد المسمى P176، وهو ببتيد مكون من 38 جزيئة من N-Terminus للوحدة AgB8/1. كان الأداء التشخيصي الظاهر مقدمة للحصول على استعمال AgB الطبيعي (Gonzalez-Sapienza وزملاؤه، 2000).

المستضد Ag5:

هو معقد ليبوبروتين يملك كتلته جزيئية عالية جداً تقدر بنحو 400 كيلو دالتون، يتضمن المركبات 57 و67 كيلو دالتون. يتفكك في الشروط المخفضة إلى الوحدات 38 و 22 و 24 كيلودالتون (Lightowlers وزملاؤه، 1989). ومن المتعارف عليه بأن المستضد Ag5 أحد المستضدات المستخدمة بشكل واسع جداً في التشخيص المناعي لداء المشوّكات الكيسيّة. وقد أوضح ذلك من خلال ترسيب أضداد المصل للمستضد Ag5 (Arc 5) بوساطة الرحلان الكهربائي أو بتقانات مشابهة. وقد اعتبر في البداية بأنه يملك نوعية تشخيصية مطلقة للكشف عن أخماج المشوكة الحبيبية، لكن الدراسات التالية أظهرت بأن له فاعلية تصالبية مع أنواع الشريطيات الأخرى لاسيّما المشوكة متعددة الحجرات والكيسة المذنبة الخنزيرية، ومع أنواع أخرى من الديدان عند حضن هذه المستضدات مع أضدا الأمصال البشرية(Shepherd و McManus، 1987) عند استعمال مجموعة أمصال مختلطة من مرضى الكيسات العُذَارِيّة أعطت فاعلية نوعية عالية مع المستضد Ag5، وجزئياً مع مكتبة الدنا cDNA المكملة المسماة Eg6 المعزولة (Facon وزملاؤه، 1991). إن القطعة

البروتينية المتأشبة والتي شفرت (Encoded) بوساطة التتابع الذي تعرف على الأضداد وحيدة النسيلة النوعية للمستضد Ag5 (Chamekh وزملاؤه، 1990). إضافة إلى ذلك، تعرفت الأضداد المنقاة (Eluted) من البروتين المتأشب على الوحدة 38 كيلودالتون للمستضد Ag5.
باستعمال بادئات (Primers) تتابع (Sequence) المستضد Eg6، قد تضاعف (Amplified) التتابع الجديد المشفر للمستضد 29 كيلودالتون الذي سمي P-29 من الرؤيسات الأولية للمشوكة الحبيبية. يملك التتابع نسبة تطابق (Identity) 100% من تتابع الأحماض الأمينية المشفرة بوساطة Eg6. إن المستضدان P-29 و Ag5 متقاربان مناعياً بالرغم من أنهما مختلفان بروتينياً (Gonzalez وزملاؤه، 2000).

عموماً فقد حصل الباحثون على المستضدات العُدَارِيّة من السائل العُداري أو مستخلص الغشاء الجليدي، أو اطراحات ومفرزات الرؤيسات الأولية أو الدودة الكاملة. ويعد السائل العُداري المصدر الرئيسي للتشخيص المناعي لداء الكيسات العُدَارِيّة عند الإنسان والحيوان بالاعتماد على مستضدين رئيسين هما Ag-5 و Ag-B. كما استعمل المستخلص الجسمي في التشخيص المناعي عند الكلاب والثوي المتوسط من المجترات، ومن ناحية أخرى استعملت المستضدات البرازية (Coproantigens) الناتجة من مفرزات الدودة واطراحاتها في التشخيص المناعي في الثوي النهائي (Carmena و زملاؤه، 2006). استفردت هذه المستضدات بعد ديلزة سائل الكيسات العُدَارِيّة البشرية للتخلص من البروتينات عديمة الأهمية الاستضدادية، وذلك عن طريق النبذ والتجفيد والترسيب بسلفات الأمونيوم، والترشيح في هلامة السيفادكس، Sephadex (Capron و زملاءه، 1967؛ رمضان، 1992)، كما تمّ عزل مستضد الكيسات العُدَارِيّة وتنقيتها من سائل الكيسات العُدَارِيّة الغنمية، بوساطة DEAE-Cellulose-Chromatography، وباستعمال السيفادكس G-200، فقد تشكلت قمتين وأظهر المستضد المعزول حساسيّة عالية، ونقاوة ونوعيّة عاليتين أيضاً للمشوكة الحبيبيّة (Nandi و Ranmajeyam، 1990). وقد حصل Bout وزملاؤه (1974) أيضاً على أربع قمم اثناء الترشيح والاستفراد في السيفادكس G-200، وفي دراسة سابقة حصل الياسين (2006) على قمتين باستفراد السائل العُداري الغنمي الكبدي والرئوي في السيفادكسG-50، كما حصلت رمضان(1992) التي استعملت السائل العُداري الرئوي البشري على قمتين أيضاً في السيفادكس G-50 (Hamel و Ris، 1982؛ Nandi وRamajeyam، 1990)، في حين تشكلت أربع قمم من جراء استفراد بروتينات السائل العُداري الكبدي الغنمي في السيفادكس G-25 ثم إمرارها في عمود السيللوز DEAE (Quilici وزملاؤه، 1971). بينما تشكلت ثلاث قمم واضحة ومتقاربة في الارتفاع لدى استفراد العينة العُدَارِيّة الكاملة (الأغسية، السائل، الرؤيسات) في الإصابة المزدوجة في عمود

السيفادكس G-50 (الياسين، 2006). أما عند استفراد بروتينات بعض الديدان الأخرى، فقد حصل Kandil وزملاؤه (2004) على ثلاث قمم عند استفراد بروتينات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة، عند استعمال البروتين الخام مباشرة في عمود السيفادكس، وحصلوا على عصابتين في هلامة عديد الأكريلاميد كانت كتلها الجزيئيّة النسبية 103 و45 كيلودالتون، وكانت العصابة الثانية أكثر وضوحاً بينما كانت الأولى فاتحة وذلك باستعمال المستضد الخام للكيسة المذنبة دقيقة الرقبة وأيضاً للكيسة المذنبة الغنمية والكيسة المذنبة البقرية كانت لها النتيجة نفسها. في حين حصل Sarma وزملاؤه(2002) على قمتين عند استفراد المستضد الخام للكيسة المذنبة دقيقة الرقبة. أما مستخلص متفرعة المعي المغصنة فقد انفصلت إلى 6 عصائب في الرحلان الكهربائي عند صباغتها بأزرق كومازي، وتراوحت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 6 و66 كيلودالتون، بينما أظهرت 14 عصابة عند صباغتها بنترات الفضة وتراوحت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 6 و205 كيلودالتون ولم تسجل أية تفاعلات تصالبية مع المشوكة الحبيبية (Simseks وزملاؤه، 2006).

أثبت Maddison وزملاؤه (1989) أن هناك استجابات نوعيّة لأضداد أمصال المرضى المصابين بالكيسات العُدَاريّة مع العصائب ذات الكتل الجزيئيّة النسبية 12، 16، 20، 37، 38، 48 كيلودالتون. كما استخدمت العصائب ذوات الكتل الجزيئيّة النسبية 23 و 25 كيلو دالتون المستخلصة من بيوض المشوكات الحبيبيّة في هلامة عديد الأكريلاميد SDS-PAGE في تقصي وجود الأضداد النوعيّة عند الأغنام. كما تشكلت استجابات مناعيّة لخمس عصائب كانت كتلها الجزيئيّة النسبية 116، 98، 68، 57، 45 كيلودالتون مع أمصال البشر والأبقار والأغنام المخموجة بالكيسات العُدَاريّة وذلك عند استخدام 20 عصابة تراوحت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 8 و120 كيلودالتون (Fadwa و Knobloch، 1989؛ Facon وزملاؤه، 1991؛ Leggatt و McManus، 1994؛ Profumo وزملاؤه، 1994؛ Sanchez وزملاؤه، 1991؛ Heath و Lawrence، 1996). وقد وجد Kanwar وزملاؤه (1992) أن السائل العُداري الغنمي يحتوي على 15 عصابة بروتينيّة، وقد بلغت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 8 و116 كيلودالتون، وقد تشكلت الاستجابة المناعيّة الخلطيّة في الإنسان ضد 12 عصابة بروتينيّة، وسجلوا استجابات مناعيّة تطورت في أمصال مرضى الكيسات العُدَاريّة ضد العصائب 8، 16، 24، 38، 45، 58 كيلو دالتون، غير أن هذه العصائب شكلت تفاعلات تصالبيّة مع أمصال الأشخاص المصابين بأخماج أخرى. على أيّة حال، فإن الاستجابات المناعيّة النوعيّة تركزت في العصابتين 8 و 16 كيلودالتون. بينما حصلت رمضان(1992) على خمس عصائب بروتينيّة من خلال فصل سائل الكيسة العُدَاريّة الرئويّة البشريّة في سورية، وبلغت كتلها النسبيّة نحو 13182، 29512، 45708، 57543، 67608 دالتون، كما حصلت أيضاً على خمس

عصائب عند فصلها لعينة أخرى من السائل العُداري الرئوي البشري من منطقة جغرافيّة مختلفة عن المنطقة الأولى وكانت كتلها الجزيئيّة النسبية 19952، 39810، 47863، 58884، 67000 دالتون. إضافة إلى ذلك، فقد شكلت بروتينات السائل العُداري للكيسة الكبديّة عند الأغنام العواس السورية خمس عصائب وكانت الكتل الجزيئيّة النسبية الموافقة لها 85114، 67000، 53703، 26915، 15849 دالتون. كما انفصلت بروتينات السائل العُداري الرئوي إلى خمس عصائب أيضاً كانت كتلها الجزيئيّة النسبية 67000، 53703، 38000، 29615، 13000 دالتون في هلامة عديد الأكريلاميد في الشروط المخفضة (الياسين ، 2006). في حين انفصلت بروتينات سائل الكيسات العُدَاريّة الكبديّة الغنميّة في هلامة الأكريلاميد، إلى تسع عصائب بروتينيّة نوعيّة كانت كتلها الجزيئيّة النسبية 200، 116، 98، 68، 58، 38، 24، 16، 8 كيلودالتون، وكانت العصابة 116 كيلو دالتون هي الأكثر نوعيّة عند الأغنام في حين كانت عند الإنسان العصابتان ذوات الكتل 68 و 8 كيلودالتون باستخدام اختبار التبصيم المناعي (Western Blot). علاوة على ذلك، فقد تفاعلت تحت الوحدات 38، 58، 68، 98، كيلودالتون تصالبياً مع الدودة المتورقة الكبدية والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة وأيضاً مع متفرعة المعي المغصنة (Dicrocoelium dendriticum) والأسطونيات الشعرية (Trichostrongylidae) ومع تحت أنواع ديدان البارامفستومم (Paramphistomum) والمسلكة (trichuris) (Burgu وزملاؤه، 2000). فقد أشارت معظم الدراسات بأن تحت الوحدة المستضدية 8/12 و16 كانت الأكثر نوعية بين تحت الوحدات حيث كانتا الأقل فاعلية تصالبية (Kaderi، 1991؛Haniloo وزملاؤه، 2005).

وقد حصل Derbala (1998) على سبع عصائب لدى فصل السائل العُداري عند الجمل (100، 72.4، 61.3، 46.8، 38.0، 34.7، 28.8 كيلو دالتون) و3 عصائب عند الحمار (143.2 و128.2 و44.6 كيلو دالتون)، إضافة إلى ذلك، فقد فصل 8 عصائب من رؤيسات الكيسات العدارية عند الحمير (157.9، 150.8، 131.2، 107.1، 89.1، 79.4، 67.6، 53.7 كيلودالتون) و12 عصابة من رؤيسات الكيسات العدارية عند الإبل (136.8، 125.9، 102.3، 89.1، 64.6، 54.9، 38، 34.7، 29.5، 26.3، 22.9، 19.9 كيلودالتون). وفي دراسة أخرى أجريت على الكيسات العُدَاريّة عند الإبل وجدت أن السائل العُداري الرئوي يحتوي على 12 بروتين (105، 79، 62، 49، 38، 28، 24، 21، 18، 8 كيلو دالتون وعصابتين فوق 105 كيلودالتون)، كما وجدت بأن العصائب 38، 36، 29، 18، 16، 12، 8 كيلودالتون تفاعلت مع أمصال المرضى بداء الكيسات العُدَاريّة وذلك باستعمال تقنية EITB (Sabry، 2007).

بينما حصل Amelio وزملاؤه (1985) على أربع عصـــائب (13000، 29000، 52000، 67000 دالتون) بتطبيق تقنيّة الرحلان الكهربائي على سائل الكيسة العُدَاريّة الكبديّة البشريّة. وأيضاً فصل Al-Yaman وKnobloch (1989) مستضدين من السائل العُـــداري همـــا Eg20 و Eg48 كيلودالتون، وكان المستضد Eg20 نوعياً أكثر من المستضد Eg48 الذي شكل تفـــاعلات تصـــالبية بنسبة 33% مع أمصال المرضى بالكيسات متعددة الحجرات. في حين حصلت Kaderi(1991) لدى مقارنة ثلاثة أنواع من المستضدات (الرؤيسات، السائل، الغشاء) لثلاثة أنواع من الأثوياء (الأغنـــام والأبقار والإنسان) نفس العصائب، إذ تحتوي الرؤيسات على أكثر من 20 عصابة أمـــا مســـتخلص السائل والغشاء فيحتوي نحو 15 عصابة بعضهم شائع مثل العصابة 60. وقد تعرفت عدة عصـــائب تصالبياً على أمصال البشر المصابين بالبلهارسيا، والليشمانيا، والمقوسة القندية، والسرطان.

1-11-1-3- حدود الاختبارات الحالية(Laminations of Current tests):

مع أنه تم البرهان على الأهمية التشخيصية للمستضد AgB إلا أنه مازال هناك صعوبات في نقص الحساسية والنوعية ومشاكل في معايرتها (Standardization) (Babba وزملاؤه، 1994). وكانت الفاعلية التصالبيّة مع المستضدات من الطفيليات الأخرى لاسيّما الشريطيات والتي تعد إحدى المشاكل الرئيسية، مثل الشريطية التيسانيزية والدودة المتورقة الكبدية والتي تكون محدودة الانتشار في سورية، وأيضاً الشريطية المونيزية والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة ذات الانتشار العالي في سورية (Liu وزملاؤه، 1993؛ Lightowlers و Gottstein، 1995؛ Poretti و زملاؤه، 1999؛ Ortona وزملاؤه، 2000؛ Al- Khaled، 1999؛ Rott وزملاؤه، 2000؛ الياسين والخالد، 2008). بالإضافة إلى ذلك، أوضحت نتائج الرحلان الكهربائي أحادي الاتجاه وثنائي الاتجاه والتسلسل الدقيق (Microsequencing) أن المستضدان AgB و Ag5 يمكن أن يتعقد استخدامها في التشخيص المناعي (Zhang و McManus، 1996). ومازالت تستعمل الطرائق التقليدية بشكل واسع لتنقية المستضدان AgB و Ag5 التي يمكن أن تحدد نقاوة المستضد. لقد عزلت ونقيت المركبات المستضدية للمشوكات من خلال تطبيق مختلف طرائق التنقية مثل كروماتوغرافيا مبادل الايونات (Anion- exchange chromatography) (Al-Yaman و Knobloch، 1989؛ Gonzalez وزملاؤه، 1996) والتنقية التآلفية بالبروتين A والأضداد وحيدة النسيلة (Affinity purified) (Gottstein، 1985؛ Gonzalez وزملاؤه، 1996؛ Zhang و McManus، 1996) وتقنية IsoElectric Focusing (Ito وزملاؤه، 1999) والكروماتوغرافيا التآلفية (Affinity Chromatography) (Barbieri وزملاؤه، 1993؛ Zhang و McManus، 1996).

طبقت تقانات معايرة المستحضرات المستضدية بهدف تحسين أداء التشخيص المناعي من خلال توصيف المستضدات الجديدة، وأيضاً تم الكشف عن أصناف الغلوبيلينات المناعية المتميزة. فقد تم مقارنة النوعية والحساسية التشخيصية للرحلان الكهربائي والمقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم والتبصيم المناعي في الكشف عن الأضداد المستضد AgB الطبيعي والمتأشب وأجزاء السائل العُداري المستفرد في أمصال المرضى (Ortona وزملاؤه، 2000).

وقد صنفت أمصال مرضى الكيسات العُدَاريّة المفحوصة وفقاً لنوع الكيسات، وقد اختبرت مع أمصال المصابين بأمراض طفيلية أخرى ومع مرضى الكتل الورمية (Carcinomas) الرئوية والكبدية والكيسات المصلية كما أختبرت مع أمصال الأشخاص الأسوياء (Healthy control)، إذ أعطى التبصيم المناعي لمقاطع السائل العُداري حساسية أعلى (80%) ثم المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم (72%) ثم الرحلان الكهربائي المناعي (IEP) (31%). وقد انخفضت الحساسية التشخيصية بشكل واضح عند الكيسات الناضجة من نمط I-II حتى النمط VII المحددة بالإيكو (Ultrasonography).

شكل التبصيم المناعي AgB-IB للمستضد الطبيعي والمتأشب حساسيات مشابهة (74%). لكـن أعداداً كبيرة من مرضى المشوّكات الكيسيّة المثبتة إكلينيكاً وجراحياً (20%) كـانوا سـلبيين بعـد استعمال التبصيم المناعي لتقييم الاستفادة من جزئية المشوكة الحبيبية المتأشبة الأخرى في الكشـف عن أضداد IgE في أمصال المرضى إذ كان نحو 33% ايجابياً (Ortona وزملاؤه، 2000).

تشير تلك الدراسات إلى أنه يمكن أن يتحسن الاختبار المصلي للسائل العُداري بوساطة مزج عدة مستضدات معروفة محتوية على الببتيدات التركيبية، ومن خلال تصنيع ببتيدات نوعية جديدة للمشوكة الحبيبية التي تفاعلت مع الأمصال السلبية الكاذبة.

1-11-1-4- مراقبة معالجة المشوّكات الكيسيّة في الإنسان بالتشخيص المناعي:

يحتاج مرضى داء المشوّكات الكيسيّة إلى مراقبة دقيقة بعد المعالجة الجراحية أو المعالجة الكيميائية للتأكد من بقائهم خاليين من المرض. تعد طريقة التقصي عن وجود الأضداد فعالة في مراقبة المرضى بعد المعالجة. يصبح تحت الصف IgG4 سلبي في المرضى الذين أزيلت الكيسات منهم بنجاح وذلك مباشرة بعد الجراحة (Guerri وزملاؤه، 2000). على النقيض من ذلك، أثبت لدى المرضى الذين انتكسوا بالمرض عيارات عالية من IgG4 في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم (Rigano وزملاؤه، 1995b، 1996؛ Guerri وزملاؤه، 2000). بحيث يتوقع أن تحت الصف IgG4 يشكل علامة جيدة لمتابعة مرضى الكيسات العُدَاريّة. كما يكون أيضاً الضد IgE

النوعي و IgM مفيداً في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم (Rigano وزملاؤه، b1995، 1996؛ Zarzosa وزملاؤه، 1999). يمكن أن تستنفذ الخلايا PBMC المعزولة من مرضى المشوّكات الكيسيّة في المختبر بوساطة مستضدات السائل العُداري (Hernandez وزملاؤه، 1997؛ Rigano وزملاؤه، 1998) بهدف إنتاج كميات كبيرة من السيتوكينات (Cytokines). وقد يفيد السيتوكين IL-4 في متابعة مرضى المشوّكات الكيسيّة. (Rigano وزملاؤه، 1999).

كما أن الكشف عن المستضدات الجائلة تعد أيضاً طريقة لمراقبة المرضى بعد العمل الجراحي ومراقبة النمو الديناميكي وفعالية الكيسات (Lightowlers و Gottstein، 1995؛ Ravinder وزملاؤه، 1997؛ Ferragut وزملاؤه، 1998). يشكل بروتين الطفيلي EF-IB/8 الموجود في السائل العُداري والرؤيسات الأولية علامة حساسة للخمج (Margutti وزملاؤه، 1999). وقد لوحظت تشكل نسبة عالية من الاستجابات المناعية الخلطية ضد EF-IB/8 في مرضى المشوّكات الكيسيّة الذين لديهم كيسات متكلسة أكثر من المرضى بالكيسات الحية، وهذا يوحي أن البروتين يتحرر في داخل السائل العُداري بعد تنكس الرؤيسات الأولية، مما يشير إلى إمكانية استعماله في المراقبة المناعية لداء المشوّكات الكيسيّة، ولمزيد من المعلومات، يمكن أن يلعب EF-IB/8 دور المفتاح في الاضطرابات الاليرجية (شري، احمرار، أو صدمة تحسسية)، وغالباً ما تتعقد (Complicate) الإصابة بالمشوّكات الكيسيّة.

1-11-1-5- تشخيص المشوّكات السنخية في البشر:

يعتمد تشخيص المشوّكات السنخية على الأعراض والمعايير بشكل مشابه لتشخيص المشوّكات الكيسيّة، فتتضمن تاريخ الحالة المرضية، والأعراض المرضية، والآفة المرضية المميزة بالتصوير، و تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR)، واختبار التألق المناعي، والمناعة النسيجية الكيميائية، والتشخيص المناعي (Pawlowski وزملاؤه، 2001). إذ يؤمن التشخيص المناعي للمشوّكات السنخية كما في المشوّكات الكيسيّة دوراً مكملاً لاجرائيات الكشف المبكر عن الخمج. تكون الطرائق مشابهة لتلك المستعملة في المشوّكات الكيسيّة، لكن عادة ماتكون الفحوصات المصلية للكشف عن الأضداد أكثر موثوقية. تعد المشوّكات السنخية مرضاً شديد الخطورة إذ تشكل نسبة موت عالية، لذلك يعد الكشف المبكر أكثر حيوية لنجاح المعالجة (Ammann وزملاؤه، 1988).

يعد المستضد EM2 مستضد طبيعي ونوعي، وقد فصل من سليفة الشريطية المشوكة متعددة الحجرات (Gottstein، 1985)، وقد أعطى نتائج مشجعة في التشخيص المناعي عند البشر المصابين بالمشوكة السنخية (Gottstein، 1992). واختلفت حساسيات اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم للمستضد بالاعتماد على المنشأ الجغرافي للمرض؛ حيث تراوحت مابين 77% و

92% (Gottstein وزملاؤه، 1993). فقد ازدادت حساسية EM2plus ELISA إلى نحو 97% من خلال اتحاده مع البروتين المتأشب المسمىII/3-10 . أظهرت مقياسات EM2plus تفاعلات تصالبية مع مستضدات المشوّكات الكيسيّة (25.8% من الحالات) حيث تكون أعلى منها في الحالات الفردية في EM2 (5.6%)، و II/3-10 (6.5%) لكن تشكلت تفاعلات تصالبيّة محدودة مع مسببات الأمراض الأخرى. فقد تم تصنيع EM2plus ELISA تجارياً بغرض تشخيص المشوكة السنخية إكلينيكياً (Gottstein وزملاؤه، 1993). وأيضاً كاختبار الكاشف الفاحص في المجتمع (Bresson-Hadni وزملاؤه، 1994).

أظهر المستضد 18 كيلو دالتون (EM-18) المفصول من الرؤيسات الأولية للكيسات السنخية وجود نوعية عالية (96.8%) وحساسية عالية (97%) مع قوة للتفريق بين المشوكة الكيسيّة والسنخية، والأخماج الطفيلية الأخرى، وأيضاً للتفريق بين المشوكة السنخية الحية والميتة (Ito وزملاؤه، 1997a، b ؛ Jiang وزملاؤه، 2001). وقد استخدمت كلا EM2plus ELISA و EM-18 في التبصيم المناعي لوقت طويل لمراقبة مرضى المشوّكات السنخية الذي أخضعوا للمعالجة الكيميائية (Ma وزملاؤه، 1997). كما أن البروتينات المتأشبة EM13 و EM10 التي عبرت عن مكتبة الدنا المكملة المكلونة (Cloned cDNAs) للرؤيسات الأولية المشوّكات متعددة الحجرات كانت أيضاً ذات قيمة جيدة في التشخيص المناعي للمشوكة السنخية. أظهر الفوسفاتاز القلوي المنقى من سليفة الشريطية متعددة الحجرات خصائص تشخيصية ممتازة بنوعية بلغت نحو 100% بدون أي نقصان في الحساسية (100%). ولها قوة واضحة للاستخدام في التشخيصات الروتينية ومتابعة مرضى المشوّكات السنخية.

1-11-2- التشخيص المناعي للمشوكات الكيسية في الحيوانات (immunodiagnosis of cystic *Echinococcosis* in animals):

أجريت أبحاث قليلة جداً نسبياً اهتمت بتطوير تقانات التشخيص المناعي لأخماج المشوكة الحبيبية في الحيوانات الأهلية مثل الأغنام والأبقار مقارنة مع التي أجريت في الإنسان. يعتمد حديثاً تشخيص الكيسات العُدَاريّة للمشوكة الحبيبية في الأثوياء المتوسطة بشكل رئيسي على الخزعة (Necropsy) والصفة التشريحية. ويعد التشخيص المصلي الدقيق لأخماج المشوّكات الكيسيّة في الأبقار صعباً بسبب التفاعلات التصالبيّة مع العديد من أنواع الشريطيات الأخرى لاسيّما الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة والكيسة المذنبة الغنمية (Yong وزملاؤه، 1984؛ Lightowlers و Gottstein، 1995). تشكلت استجابات ضدية ضعيفة في الحيوانات عند الخمج بالمشوكة الحبيبية مقارنة مع مستويات

الأضداد النوعية العالية نسبياً التي تشاهد في الأخماج البشرية (Lightowlers و Gottstein، 1995). تعد الأغنام الثوي المتوسط الرئيسي للمشوكة الحبيبية في أغلب مناطق العالم الموبوءة، إذ يمكن قياس تركيز أضداد مختلف المستضدات بما فيها المستضد Ag5 في أمصال بعض الأغنام، لكن ليست كل الأغنام المصابة (Jenkins و Rickard، 1986 a) كما هو في الإصابات البشرية. ولم يبد الكشف عن المستضدات الجائلة أية فائدة تشخيصية (Eckert وزملاؤه، 2001).

لقد تم تطبيق تقانة المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم في التشخيص المناعي لداء الكيسات العُدَاريّة في الحيوانات باستخدام مختلف أنواع المستضدات (Yong وزملاؤه، 1984؛ Jenkins و Rickard، 1984، b1986). ويمكن الكشف المبكر عن أضداد مستضدات الكيسات العُدَاريّة في الأغنام المخموجة تجريبياً بعد 4-6 أسابيع من الخمج (Yong وزملاؤه، 1984) وتستمر على الأقل مدة 4 سنوات (Al-Yaman و Knobloch، 1989). وعلى أية حال، التفاعلات التصالبيّة المصلية بين المشوكة الحبيبية وأنواع الشريطيات الأخرى تعطي تشخيص نوعي محدود في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم باستخدام مستضدات الطفيلي الخام (Yong وزملاؤه، 1984؛ Jenkins و Rickard، 1984). يتم تقليل الفاعلية التصالبيّة بشكل جزئي من خلال التنقية التالفية للمستضد الخام باستعمال أضداد من حيوانات ممنعة بمستضد متجانس (Jenkins و Rickard، b1986) أو الاستنفاذ التالفي (Affinity depletion) للمستضدات ذات الفاعلية التصالبيّة بالأضداد وحيدة النسيلة (Jenkins و Rickard، 1984). وتستطيع أن ترتبط مركبات السائل العُداري الغنمي مع الغلوبيلينات المناعية الغنمية بشكل غير نوعي وتساهم في زيادة التفاعلات الايجابية الكاذبة حتى مع أمصال الحيوانات الخالية من الشريطيات (Jenkins و Rickard، 1984). لقد تقلصت التفاعلات غير النوعية بشكل كبير جداً بعد الاستنفاذ التآلفي للمستضد الخام مع كل من الأضداد وحيدة النسيلة والغلوبيلينات المناعية من الحيوانات غير المخموجة بالكيسات العُدَاريّة.

يفرق المستضد المستنفذ تآلفياً (Affinity depletion antigen) بشكل مصلي بين قطعان الأغنام المخموجة بالكيسات والأغنام غير المخموجة في المنطقة نفسها؛ وعلى أية حال، يكون التشخيص النوعي ضعيفاً في خمج الأغنام الفردية من منطقة إلى أخرى، ويعتقد أن تغيرات الاستجابات الضدية في ذراري الطفيلي المختلفة لها دوراً في تشكيل هذه الاختلافات (Jenkins و Rickard، 1984).

لقد استخدمت المستضدات متعددة السكريد الناتجة من مفرزات الرؤيسات الأولية المشوكة الحبيبية خلال الاستنبات في الزجاج في المختبر، أو من المستخلص الفينولي لأغشية الكيسات العُدَاريّة الفأرية لفحص أمصال الأغنام (Jenkins و Rickard، 1985). مع أن الاستجابات الضدية

كانت أعلى منها في الأغنام المصابة بالكيسة المذنبة دقيقة الرقبة أو الكيسة المذنبة الغنمية بشكل واضح، غير أنها أعطت تفاعلات تصالبية بشكل عالي لاسيّما مع أمصال الحيوانات المصابة بالكيسة المذنبة دقيقة الرقبة. فلم يتوفر أي مستضد حساس أو نوعي بشكل كافي، كما يمكن استعماله في الاختبارات المصلية الروتينية (Jenkins و Rickard، 1985). وتتوافر الآن تقانات تحديد تسلسل DNA بحيث تسمح لتمييز أنواع ذراري المشوّكات الكيسة باستخدام الكيسة العُدَارِيّة من الأثوياء المتوسطة (Thompson و McManus، 2001).

1-11-3- تشخيص المشوكات في الأثوياء النهائية (Diagnosis of *Echinococcosis* in definitive hosts):

استعملت طريقتين رئيسيتين بشكل واسع في الكلاب هما: التنضيف (Purgation) بالأريكولين ومشتقاته لطرد الديدان، وتشريح (Necropsy) الأمعاء الدقيقة بعد النفوق، وتعد الصفة التشريحية الطريقة الأمثل في الثعالب والأثوياء النهائية الأخرى.

كما طورت طريقتين أساسيتين في التشخيص المناعي للمشوكة الحبيبية والمشوكة متعددة الحجرات في الأثوياء النهائية وهما: المقايسة لأضداد المصل النوعي والكشف على منتجات الطفيلي في البراز (Copro-antigen)، إذ أظهرت أضداد المصل النوعي بأنها قابلة للكشف في دم الكلاب بعد الخمج التجريبي بالشريطيات (Taeniid cestodes)، ومن ضمنها المشوكة الحبيبية. وذلك باستعمال المستحضرات المستضدية للكيسة العُدَارِيّة في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم (Jenkins و Rickard، 1984، 1986 b). لقد أثبتت ظهور الأضداد النوعية عقب الخمج التجريبي بالمشوكة الحبيبية في الكلاب، وقد فحصت باستعمال مستضدات مشتقة من الكرة المشوكة (Barriga و Al-Khalidi، 1986؛ Singh و Dhar، 1988؛ Sixl وزملاؤه، 1988). وتتحرر بعض البيوض في الأمعاء الدقيقة بعد تحلل (Apolysis) القطع، إذ يمكن أن تفقس وتثقب جدران الأمعاء مسببة تحفيز الجهاز المناعي في الثوي النهائي. ويمكن أن يكشف عن الأضداد الجائلة في الدم Anti- EM2 antibodies بطريقة المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم التي تفيد الاختبار الفاحص الكاشف الأولي في مجتمعات الثعالب، لكن لم ترتبط نسبة انتشار الأضداد بنسبة الانتشار الحقيقية للخمج بالمشوكة متعددة الحجرات في الأمعاء (Gottstein وزملاؤه، 1991؛ Deplazes و Eckert، 1996). فالاختبارات المتوافرة والمعتمدة على المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم كانت لها حساسية ضعيفة ونوعية غير واضحة، وليس لها أي ارتباط مع كثافة الإصابة بالطفيلي (الحمولة) (Gasser وزملاؤه، 1992، 1990).

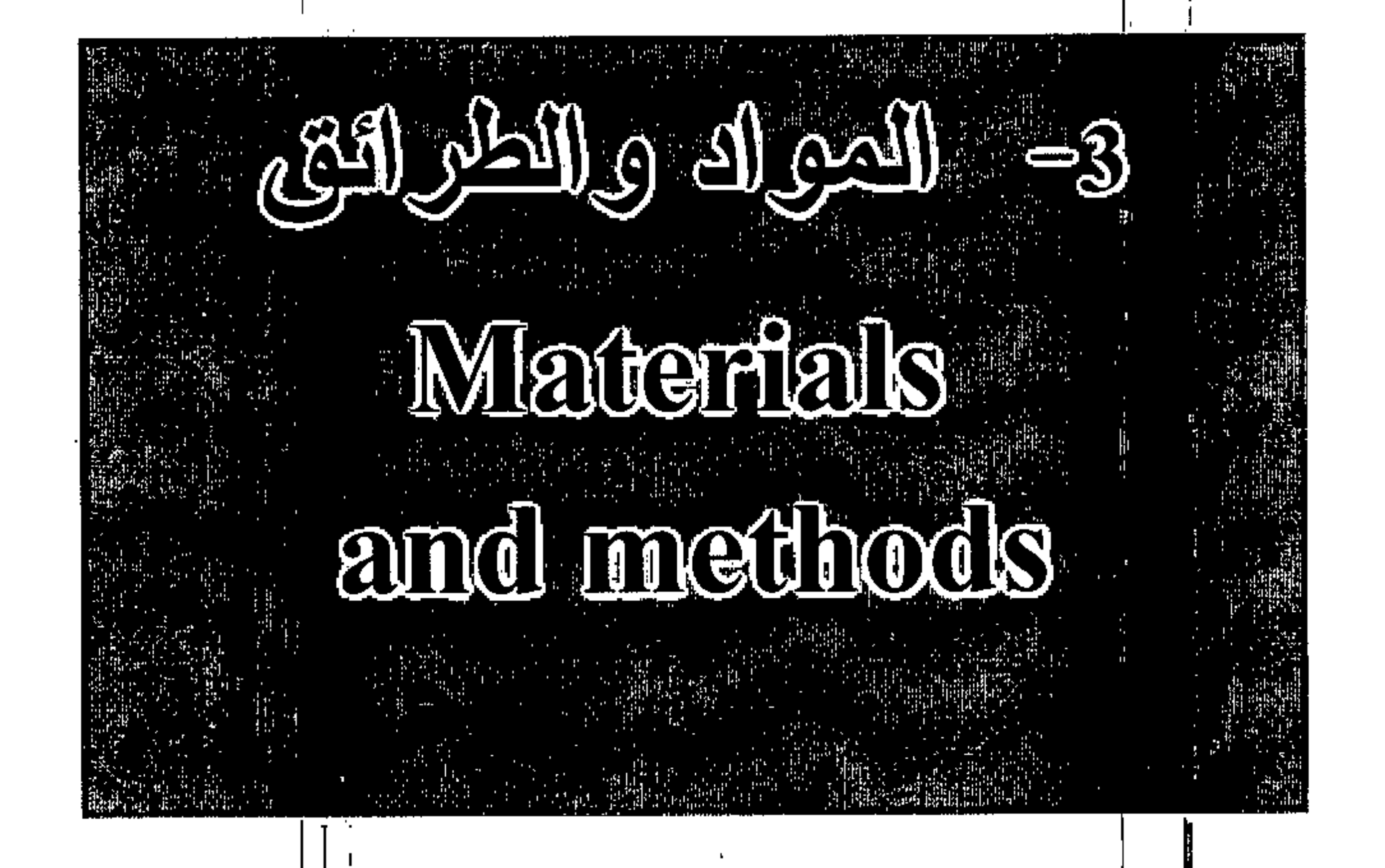
الطريقة الأساسية الأخرى المستعملة في تشخيص الخمج بالمشوّكات في الثوي النهائي وهي الكشف عن منتجات الدودة البالغة في البراز بوساطة اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم مضاعفة الساندوتشSandwich- Elisa. استعمل Craig وزملاؤه (1986، 1988) الأضداد وحيدة النسيلة النوعية للمستضد على سطح الكرة المشوكة للدودة المشوكة الحبيبية لتمييز بيوض المشوكة الحبيبية في المسحات حول الشرج أو العينات من المواقع البيئية. يكون اختبار التألق المناعي في هذا الاتجاه مزعج نسبياً، ويمكن أن تتأثر حساسيته بغياب البيوض المتقطع في عينات البراز. بالرغم من ذلك، فقد طورت عدد من المنظومات بشكل جيد واستخدمت بنجاح للكشف عن المستضدات البرازية لأنواع المشوّكات في براز الثوي من العائلة الكلبية بوساطة المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم اللاقطة للأضداد Antibody capture Elisa (Allan وزملاؤه، 1992؛ Deplazes وزملاؤه، 1992)، تتوافر الآن منظومتين تجارية من الاليزا على الأقل، مع أن الاختبارات المختلفة المطورة أظهرت بعض التفاعلات التصالبيّة مع الأخماج بالشريطيات الأخرى (El-Shehabi وزملاؤه، 2000)، وتملك تلك الاختبارات قدرة كبيرة على الكشف عن الأخماج في الفترة الظاهرة والفترة قبل الظاهرة بدرجة عالية من الحساسية والنوعية ولذلك تعد موثوقة في التقصيات الوبائية (Allan وزملاؤه، 1992؛ Frosch وزملاؤه، 1993؛ Deplazes وزملاؤه، a1994، 1999؛ El-Shehabi وزملاؤه، 2000).

كما يوجد أيضاً أهمية في الكشف عن دنا (DNA) الطفيلي في عينات البراز(Copro-DNA) لكن لايوجد اختبار متوفر للمشوكة الكيسيّة. فقد طورت المقايسة المعتمدة على تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR-based assays) للكشف عن DNA المشوكة متعددة المساكن في عينات براز الثعلب بعد عزل بيوض الطفيلي بوساطة طريقة التصفية (Deplazes و Eckert، 1996)، بلغت النوعية نحو100% والحساسية نحو 49% في 55 ثعلب مصاب. وتملك تقنية Coproantigen-Elisa قوة تشخيصية بحيث يمكن الاستغناء عن الفحص بطريقة التشريح في التطبيقات الحقلية، وتكون تقنية Copro-DNA ذات قيمة في إثبات نتائج المستضدات البرازية الايجابية وأيضاً في التشخيص الفردي عند الحيوانات (Deplazes و Eckert، 1996).

2- الأهداف (Objectives)

تأتي أهمية هذا البحث من كونه يندرج في إطار استكمال الأبحاث العلمية المتعلقة بتحديد هوية المستضدات النوعية الملائمة لعمليات التشخيص المناعي للإصابة بالكيسات العدارية في الأثوياء المتوسطة، وبالديدان البالغة في الأثوياء النهائية، خصوصاً وأن هذا الطفيلي منتشر في بلادنا ويسبب أذيات كبيرة عند الإنسان لاسيما الأطفال والحيوانات المستأنسة، وعلى هذا فقد اعتمدت الأهداف الآتية لانجاز هذه الدراسة:

1. تحديد المستضدات الرئيسة للكيسات العُدَارِيّة(الرؤيسات والسائل العُداري في الكبد والرئتين) وخصائصها المناعية.
2. تقييم القدرة الاستمناعية لمستضدات السائل العداري الكبدي للتحري عن الأضداد النوعية للكيسات العدارية في أمصال الأغنام العواس السورية لاستخدامها في المسوحات الوبائية وتشخيص الإصابة باختبار المقايسة المناعية لبمقترنة بالإنظيم.
3. دراسة التفاعلات التصالبية مع الديدان الأخرى من خلال تحضير أمصال وحيد النوعية تجاه المستضدات ذات الفاعلية المناعية باستعمال اختبارالتبصيم المناعي.
4. مقارنة بين المستضدات في الإصابتين المفردة (كيسات على الكبد فقط أو الرئتين فقط) والمزدوجة (كيسات على الكبد والرئتين معاً).


3- المواد والطرائق
Materials
and methods

أولاً: العينات (Samples):

1- جمع عينات الدم:

الأجهزة والأدوات:

- موازين حسّاسة، AB 204-S METTLERTOLEDO ، دقة 0.1 ملغ.
- ممص كهربائي .
- برّاد مع مجمدة.
- محاقن بلاستيكيّة عقيمة.
- مجموعة زجاجيات وصواني ومقصات وملاقط .أرقام بلاستيكيّة، وأكياس نايلون.
- أنابيب زجاجية مفرغة من الهواء.

جمعت عينات الدم (الشاهد الايجابي والشاهد السلبي) من الأغنام العواس المذبوحة في المسالخ المحلية في حماة وريف دمشق، والتي بلغ عددها 75 عينة دم، منها 40 عينة دم من حيوانات مصابة بالكيسات العُدَارِيّة عيانياً(22 إصابة مزدوجة في الكبد والرئتين معاً، و 12 إصابة مفردة في الكبد و إصابتين مفردة في الرئة)، وجمعت 11عينة دم من حيوانات مصابة بالكيسة المذنبة دقيقة الرقبة، و 24 عينة دم من حيوانات غير مصابة (سليمة ظاهرياً). تراوح عمر الحيوانات المفحوصة بين 6 أشهر و 10سنوات، ورقّمت قبل الذبح بتثبيت لوحة بلاستيكيّة مرقّمة، ومثبتة بوساطة رباط مطاطي على الأطراف الخلفيّة للذبيحة، على أنها الأجزاء الأخيرة، التي سيتم قطعها وإزالتها بعد استخراج محتويات الحيوان البطنيّة والصدريّة. جمعت عينات الدم مباشرة من الأوعية الدمويّة النازفة (مكان الذبح)، في أنابيب معقّمة سعة 15 مل، ثم أغلقت بإحكام، وسجّل عليها رقم الحيوان وعمره المقدر، ثم نبذت وأخذت الأمصال وقسمت إلى أحجام متساوية، ثم حفظت في أنابيب بلاستكية مقاومة للتجميد في ثلاث مجموعات وضعت في ثلاثة أماكن مختلفة في الدرجة – 20°مْ إلى حين الاستعمال.

معاينة الذبائح:

فحصت كلّ ذبيحة على حدة فحصاً شاملاً بالعين المجردة، لاسيّما أحشاءها البطنيّة والصدريّة، وعن طريق اللمس والجس. علاوة على ذلك، أجريت مقاطع في بعض الحالات بالسكين في الأحشاء الداخليّة لتمييز الكيسات العُدَارِيّة الصغيرة من العقد والأورام، واستؤصل بعضها، ووضعت في أكياس بلاستيكيّة. سجل رقم الحيوان الذي أعطي له قبل الذبح. كما سجلت نوع الإصابة مفردة أم مزدوجة ومكان توضعها (الكبد، الرئتين، الطحال، الكلى)، وتم تحرّي الإصابات الطفيليّة الأخرى، لاسيّما الديدان الكبديّة (المتورقات، ومتفرعة المعي المغصنّة)، والديدان الرئويّة، الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة (*Cysticercus tenuicollis*) التي تشكل الطور اليرقي الخامج للدودة الشريطية هيداتيجينا(.T

Hydatigena) ، والتي تتوضع في النسج تحت المصليّة للثرب، والمساريقا، والكبد. وضعت الأحشاء المصابة كلّ على حده في أكياس بلاستيكيّة، دوّن عليها أرقام الحيوانات، ونقلت إلى مختبر الطفيليّات في كلية الطب البيطري لدراستها.

2- **جمع الكيسات (Collection of cysts) :**

أ- ***الكيسات العُدَاريّة:***

جمعت 10 كيسات عدارية من الكبد أو الرئتين في الإصابات المفردة (الشكل9)، و 20عينة من كيسات استؤصلت من الكبد والرئتين في الإصابات المزدوجة من حيوان،
وتجدر الإشارة إلى أنه تمت مراعاة أخذ الكيسات الكبيرة والخصبة والسليمة غير المتشققة أو المتجبنة أو المتكلسة، وكذلك استبعدت الكيسات العدارية الابنة المتشكلة عن الكيسات العدارية الأم.



الشكل9. كبد أغنام مصاب بالكيسات العُدَاريّة.

ب- ***الكيسات المذنبة دقيقة الرقبة:***

جمعت خمس كيسات مذنبة دقيقة الرقبة كاملة من الأحشاء، ثم غسلت بدارئة ملحية، ثم وضعت كل على حدة في حوجلة معقمة وأغلقت بإحكام بعد أن أضيفت إليها 0.5 غ من أزيد الصوديوم ، بعدئذ حفظت في الدرجة -20° م إلى حين الاستعمال.

ثانياً: استخلاص المستضدّات المولدة للمناعة:

وتشمل السائل العُداري والرؤيسات الأولية، والكيسة العدارية الرئوية الكاملة.

1- المواد والأجهزة:

- جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer).
- أنابيب اختبار عقيمة لجمع عينات الدم.
- مثقلة مبردة.
- مجانس العينات (HOMOGENIZER , N ISS EI AM-3 ACE).
- Triton X-100 من شركة سيرفا(Cat. No.: 37238, Lot No.: 070623).
- مزيج من مثبطات البروتياز (Protease inhibitor-mix Hp) من شركة سيرفا (Cat. No.:39106, Lot No.:P060148). وتحتوي على المركبات Aprotinin و AEBSF و Leupeptin و E-64.

2- تحضير دارئة الحلمهة:

(Triton X100 1%، 10% غليسرول، 20 ميلي مول من Tris- HCl ، 137 ميلي مول من NaCl، 2 ميلي مول EDTA ، 100 وحدة/مل من Aprotinin).

وزنت المواد الآتية:

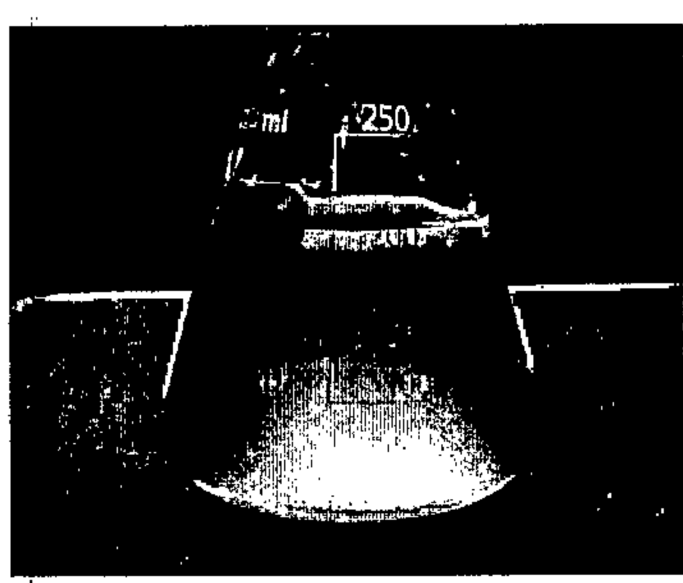
المادة	الكمية
Triton X100	0.5 مل
غليسيرول	50 مل
Tris- HCl	1.21غ
NaCl	4غ
EDTA	0.27غ
مزيج من مثبطات البروتياز	500 وحدة دولية

حلت في كمية كافية من الماء المقطر منزوع الشوارد ثم أكمل الحجم إلى 500 مل.

أ- السائل العُداري ***(Hydatid cysts fluid)*** :

جمع السائل العُداري من الكيسات العدارية بطريقة عقيمة وذلك ببزلها ووضعها في أرلينة معقمة (الشكل10). ونبذت (Centrifugation) بسرعة 10.000 دورة/دقيقة مدة 60 دقيقة في الدرجة +4°م بغية التخلّص من الرؤيسات والمحافظ النسلية (الرمل العُداري) والرواسب الأخرى، بعدئذ أضيفت إليه بضع قطرات من أزيد الصوديوم 0.1% كمادة حافظة. فحصت الرؤيسات تحت المجهر الضوئي للتأكد من حيويتها بعد صبغها بالأيوزين المائي بنسبة 0.1%، وبعدئذ تمّ تنقيّة سائل الكيسة الخاص بالحيوان

المأخوذ من عضو واحد فقط إذ تم مزج كيسات الكبد مع بعضها بشكل منفصل عن كيسات الرئة. يجدر بالإشارة إلى أنه تمّ تجنب خلط سوائل الكيسات المأخوذة من أعضاء مختلفة للحيوان الواحد، أو حيوانات مختلفة.



الشكل10. سائل عداري وفي القاع راسب من الرؤيسات الأولية.

ب_ *الرؤيسات الأولية* (*protoscolexes*) :

رسبت الرؤيسات الأولية بترك السائل العُداري ساكناً بوضع عامودي في أنبوب ابندورف ذو نهاية مخروطية، حتى ترسب الرمل العُداري في قاع الأنبوب. نقل السائل العُداري إلى وعاء آخر معقم ونظيف، وغسلت الرؤيسات الأولية بدارئة التريس(pH، 7.5)، وبالنبذ بسرعة 5000 دورة /دقيقة مدة 5دقائق، ثم تم التخلص من السائل الطافي. أعيدت العملية السابقة 5 مرات، وبذلك أزيل أثر بروتينات السائل العُداري، ثم أخذت الرؤيسات وأضيفت إليها بضع قطرات من أزيد الصوديوم تركيز 0.1%، ووضعت في الدرجة −20°م إلى حين الاستعمال.

تم استخلاص بروتينات الرؤيسات الأولية بتذويب عينات الرؤيسات الأولية المجمدة ثم إعادتها إلى التجميد مرة أخرى، وهكذا كررت العملية ثلاث مرات، ثم تمت مجانستها بإضافة الدارئة الملحيّة بوساطة المجانس (Homogenizer) بسرعة 1500 دورة /دقيقة مدة 30 دقيقة، ثم أضيفت إليها دارئة الحلمهه حجم/حجم، ووضعت في الدرجة +4°م طوال الليل ثم عرضت للأمواج فوق الصوتية مدة 5 دقائق على التبريد، وفحصت تحت المجهر بحيث لم تشاهد الرؤيسات الأولية للتأكد من حل الرؤيسات بشكل كامل، ثم نبذت بسرعة دوران 10.000 دورة /دقيقة، مدة 60 دقيقة في الدرجة +4°م، باستخدام المثقّلة المبردة، وبعدها تمّ التخلص من الراسب، وجُمع السائل الطافي الذي يحتوي على البروتينات

الذائبة، وأضيفت إليه بضع قطرات من أزيد الصوديوم (NaN_3) بتركيز 0.1%. وحفظت في ابندروف مقاوم للتجميد بمقدار امل في كل أنبوب، في ثلاث مجموعات في الدرجة −20°م إلى حين الاستعمال، بعد أن كتب عليها التاريخ واسم المستضد.

ت- عينة رئوية مفردة كاملة (الرؤيسات، السائل الغُداري):

أخذت عينة رئوية واحدة كاملة (الرؤيسات والسائل العُداري) بدون الأغشية (الغشاء الجليدي والغشاء المنتش). حيث تم معاملة الرؤيسات الاولية كما تم في الفقرة السابقة من استخلاص البروتينات من الرؤيسات الاولية من تجميد وتذويب ثم معاملتها بدارئة الحلمهة وتعرضها للامواج فوق الصوتية، ثم مزجت مع السائل العداري لتشكل المعلق البروتيني للعينة الرئوية الكاملة بدون أغشية.

ثالثاً- تحضير العينات العائدة للديدان الأخرى:

وذلك من أجل دراسة التفاعلات التصالبيّة وتشمل الديدان الآتية:

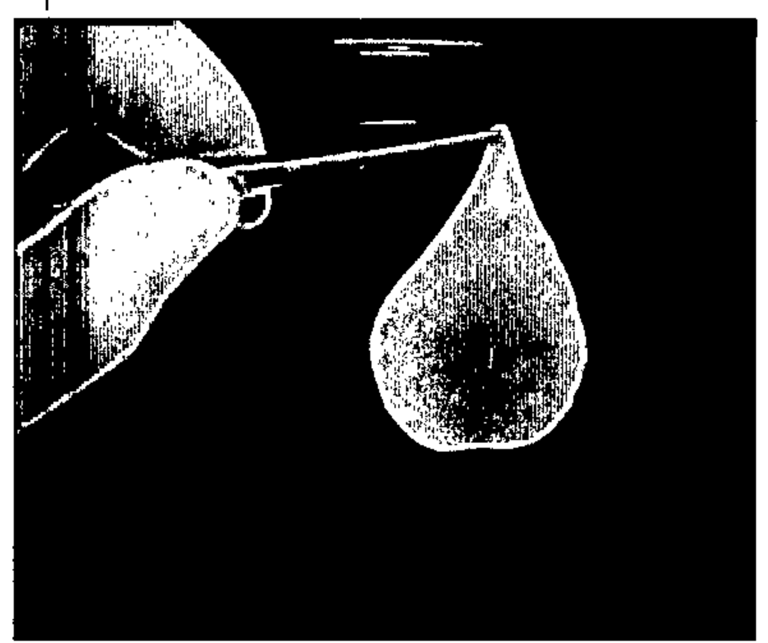
1- مستضدات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة (الشكل11) وهي الطور اليرقي الخامج للشريطية هيداتجينا.

2- تحضير مستضدات الدودة المتورقة الكبديّة (*Fasciola hepatica*) التي تتطفل في القنوات الصفراوية الكبدية.

3- الشريطية المونيزية اكسبانزا وهي شريطية شائعة عند الأغنام وتتطفل في الأمعاء الدقيقة.

4- الشريطية تيسانيزية وتتطفل في الأمعاء الدقيقة عند الأغنام.

تم الحصول على مستضدات دودتين كاملتين من الشريطية المونيزية اكسبانزا (*Moniezia expansa*)، وواحدة من الشريطية تيسانيزية (*Taenia thysaneisia*) وأربع ديدان كاملة من الدودة المتورقة الكبديّة (*Faciola hepatica*) ، وغسلت بدارئة التريس (pH، 7.5) عدة مرات، ثم أضيفت إليها 0.5 غ من أزيد الصوديوم كمادة حافظة، وحفظت في التجميد في الدرجة − 20°م. عوملت كما هو في حالة الرؤيسات الأولية، وحفظت في ابندروف مقاوم للتجميد في ثلاث مجموعات في الدرجة −20°م إلى حين الاستعمال، بعد أن كتب عليها التاريخ واسم المستضد.



الشكل11 . الطور اليرقي للشريطية هيداتجينا (الكيسة مذنبة دقيقة الرقبة).

رابعاً: تنقية البروتينات المستضدّية:

1- ترسيب البروتينات الذائبة بسلفات الأمونيوم :

مبدأ الاختبار: يرسب محلول سلفات الأمونيوم البروتينات الذائبة كافة، غير أن تراكيز معينة منه، يمكنها أن ترسب أنماط معينة من البروتينات ماعدا الألبومينات، وفي هذه التجربة رسبت جميع بروتينات السائل العُداري أو المستخلص البروتيني.

المواد والأجهزة:

- سلفات الأمونيوم (Ammonium Sulfate)، الصيغة الكيميائيّة $(NH_4)_2SO_4$ ، الوزن الجزيئي 132.14، شركة SCHARLAU، الإتحاد الأوربي.
- خلاط مغناطيسي.
- براد.
- مطياف ضوئي (UV).

طريقة العمل:

من أجل ترسيب البروتينات الذائبة، أخذ السائل العائم من العينات السابقة التي تحتوي على البروتينات الذائبة (السائل العُداري، الرؤيسات الأولية، الدودة المتورقة الكبدية، خلاصة الدودة الشريطية اكسبانزا والدودة الشريطية تيسانيزية، والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة) كل على حده. أضيفت إليه سلفات الأمونيوم، $(NH4)_2SO_4$ بنسبة 40% (w/v) من السائل الطافي بغية ترسيب بروتيناته

كلها، وترك المحلول على الخلاط المغناطيسي (Magnetic mixer) في درجة الحرارة +4°م مدة ليلة كاملة. نبذت العينات باستعمال المثفلة المبردة مدة ساعة وبسرعة 10000 دورة/ دقيقة، حيث رمي السائل العائم وأخذت الرسابة (pellet) وحلت جيداً في 2−3 مل من الدارئة الفوسفاتيّة (pH, 7.2)، وتم معايرة البروتينات باستعمال المطياف الضوئي بحيث ضبطت تركيز البروتينات على أن تكون كثافتها الضوئية (OD_{280}) مساوية 3 نانومتر.

2- الدَيْلَـــزَة (Dialysis)

أخضع المعلق السابق لعمليّة الديال، بهدف التخلص من سلفات الأمونيوم، والجزيئات البروتينيّـة الصغيرة عديمة الأهميّة الاستضداديّة، التي يقل وزنها الجزيئي عن 12000 دالتـون ضـد المـاء المقطر.

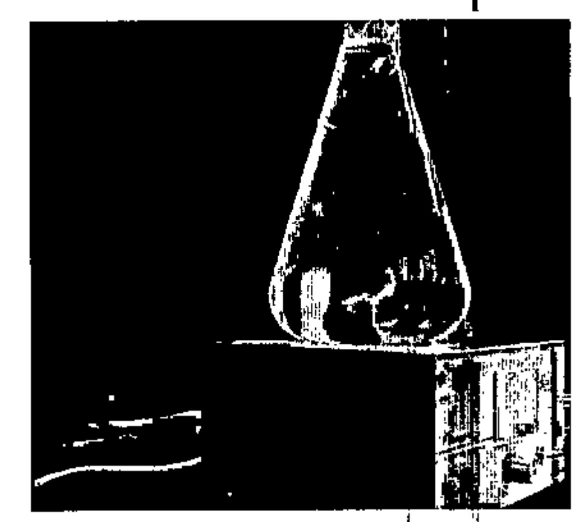
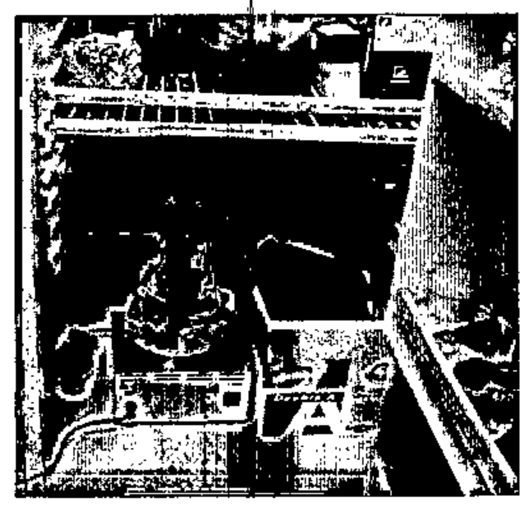
المواد:

- أكياس ديال Dialysis Memebrane-60 LA 392 1PK، وقطر 15.9 مم واستطاعة 1.99 مل/سم2.
- بولي ايتيلين غليكول 1500 (Poly Ethylene Glycol, PEG-1500 S).
- خلاط مغناطيسي.
- دارئة فوسفاتية (pH, 7.2).

طريقة العمل:

استخدمت أكياس ديال بعد نقعها مدة 24 ساعة في دارئة فوسفاتية (pH, 7.2)، ثم عقّمت بالصّاد الموصدة، وأخذت قطعة من كيس الديال بطول 10−15سم، ثم عقدت من أحد طرفيها بعقدتين محكمتين، وبعد التأكّد من سلامة الكيس، ملئ نصفه بالمعلق المراد ديلزته، وترك النصف الآخر مفرغاً من الهواء، وأغلقت بإحكام، ووضعت في الماء المقطر المضاف إليه بضع قطرات من أزيد الصوديوم بنسبة 0.1% على الخلاط المغناطيسي في درجة حرارة +4°م (الشكل12)، واستبدل الماء بعد أربع ساعات للمرة الأولى، ثم كلّ 8 ساعات، مدة 72 ساعة. وفي نهاية العمليّة تشكّل معلق حليبي داخل الكيس إشارة إلى انتهاء عمليّة الديال، وتم التأكّد من عدم وجود سلفات الأمونيوم في الماء المقطر باستعمال كبريتات الباريوم 15%. وحدّد تركيز البروتينات في المعلق الحليبي الناتج من عمليّة الديال السابقة باستعمال المطياف الضوئي على طول موجة 280 نانومتر وباستعمال محلول ألبومين مصل البقر تركيز 5ملغ/مل كمحلول عياري. بعد الانتهاء من عمليّة الديال، كثف السائل إلى

عشر حجمه عند بداية الديلزة، وذلك بغمر كيس الديال الحاوي على المعلق البروتيني في محلول بولي ايتلين غليكول السائل، أو غمره بمسحوق البولي ايتيلين غليكول (PEG 1500).

الشكل12: ديلزة المعلق البروتيني المرسب بسلفات الأمونيوم للعينات المدروسة.

3- الاستفراد بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح بالهلامة (Gel filtration chromatography):

المبدأ : الاستفراد(Separation) هو عمليّة فصل مزيج البروتينات الذائبة وفقاً لكتلهـا الجزيئيّـة النسبية، كلّ على حده، وذلك من خلال الترشيح في هلامة السيفادكس G-100 بالاعتماد على وزنها الجزيئي.

المواد:

- مثقلة المبرّدة (KUBOTA 6930, KUBOTA 1920).
- جهاز امتصاص الأشعة فوق البنفسجيّة (UV-2800)، طول الموجة 280 نانومتر، شركة ADVANTEC .
- مجمّع أجزاء مع توابعه Super Fraction Collector Sf-2120 (Fraction Collector) Advante JAPAN (الشكل13).
- هلامة السيفادكس، Sephadex –G100 ، شركة Pharmacia .
- تريس، هيدروكسي ميتيل -أمينو ميتان (Tris–HydroxyMethyl-AminoMethan) صيغتة الكيميائيّة $4C\ 11H\ NO_3$، وزنه الجزيئي(PM) 121.14، شركة SCHARLAU.

- أزيد الصوديوم (Sodium azide) الصيغة الكيميائيّة NaN3، وزنه الجزيئي (PM) 65، شركة SCHARLAU.

طريقة العمل:

تحضير عمود الكروماتوغرافيا السيفادكس:

أ- دارئة تريس Tris-HCl 25mM:

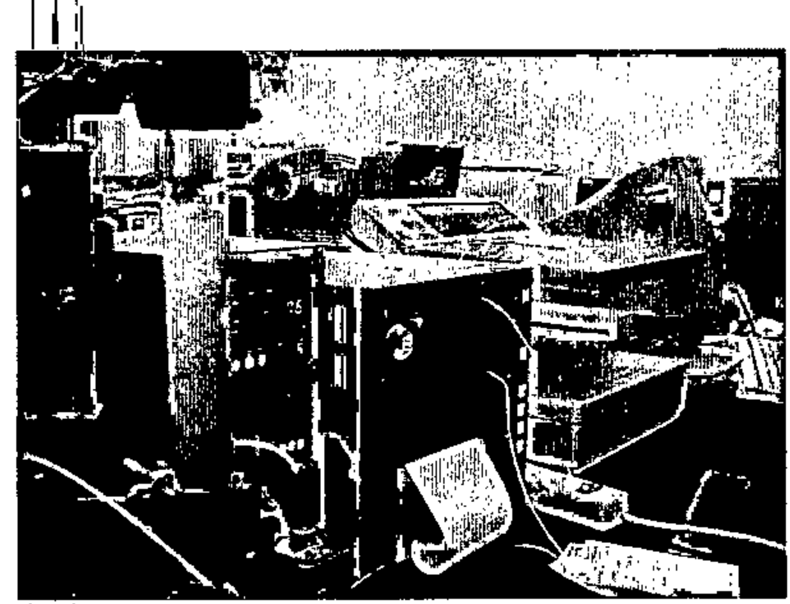
حضّرت دارئة الترس Tris-HCl على النحو الآتي:

- حضّرت 25 ميلي مول منTris، وذلك بوزن 3.0285 غ من Tris وحلّت في ليتر من الماء المقطر (المحلول 1)
- حضّرت 0.035 مول من NaCl، وذلك بوزن 2.0475 غ منNaCl، وحلّت في ليتر ماء مقطر(المحلول2).
- حضّرت 0.075 مول منNaCl، وذلك بوزن 4.3875 غ منNaCl، وحلّت في ليتر ماء مقطر(المحلول3).
- حضّرت 0.15 مول من NaCl، وذلك بوزن 8.775 غ منNaCl، وحلّت في ليتر ماء مقطر(المحلول 4).
- حضّرت دارئة تتكون من 0.035 مول من NaCl و 0.025 مول من Tris (pH=8.8) بأخذ 500 مل من المحلول 1 و 500 مل من المحلول2، و تكون درجة الباهاء (pH) قرابة 9-10، وأضيف بضع قطرات من حمض كلور الماء لتعديل الباهاء لتصل إلى القيمة 8.8 وذلك باستعمال مقياس pH.
- حضّرت دارئة Tris-HCl و pH = 8.5، بأخذ 500 مل من المحلول1 و500 مل من المحلول3، وعدّلت الباهاء بإضافة بضع قطرات من حمض كلور الماء لتصبح 8.5.
- حضّرت دارئة Tris-HCl و pH = 7.5، بمزج 500 مل من المحلول1 و 500 مل من المحلول 4 وعدّلت الباهاء بإضافة بضع قطرات من حمض كلور الماء.

ب- تحضير عمود السيفادكس:

- غسل العمود جيداً بالماء والصابون ثم بالماء المقطر المنزوع الشوارد ثم ثبت بشكل شاقولي بإحكام في المكان المحدد له على الجهاز باستخدام فقاعة زئبقية.

- وزنت 4 غرامات من حبيبات السيفادكس G-100 ونقعت في 400 مل من دارئة التريس الملحيّة (pH =7.5) مدة 24 ساعة، ثم أضيفت 5–6 قطرات من محلول أزيد الصوديوم %0.1.
- سكب الجزء الطافي خارجاً للتخلص من الحبيبات الطافية، ثم أضيفت دارئة التريس وهكذا كررت العملية عدة مرات (طريقة الإبانة)، وحرك الهلام إلى أن أصبح قوامه لبنياً.
- تمّ التخلص من الهواء في المحلول لكي لا يسمح بتشكيل فقاعات هوائيّة، بوساطة مضخة تفريغ الهواء.
- صب الهلام دفعة واحدة وبتأنٍ شديد جداً في العمود المحكم الشاقولي (الشكل13).
- يعاد التأكد من شاقولية العمود باستخدام الفقاعة الزئبقية بعد تثبيت الرأس العلوي للعمود وربطه بالجهاز.
- ترك العمود مدة 12 ساعة إلى أن استقر.
- في اليوم التالي، تمّ تشغيل جهاز مجمّع الأجزاء، لموازنة العمود المرزوم بدارئة التريس، Tris (pH =7.5) مدة يوم كامل، وبتدفق قدره 3 مل /10 دقائق.



الشكل13. عمود الكروماتوغرافيا مرزوم بالسيفادكس G-100.

- حمل عمود السيفادكس، المرزوم بالسيفادكس G-100 بـ3 مل من ألبومين المصل البقري (BSA) بتركيز 3 ملغ/مل، بعد تصفير الجهاز على محلول الشطف (دارئة التريس). للتأكد من

سلامة رزم أنبوب السيفادكس، وخلوه من وجود أيّة تكسرات، أو فقاعات هوائيّة، والتي تسبب اضطرابات في نجاح عمليّة الاستقراد.

- حمل العمود بالعينات بحجم 3 مل وبتركيز 5ملغ/مل، وبسرعة جريان 3مــل/أنبــوب/ 10 دقيقة وشطف بدارئة التريس (pH، 7.5).

4- الرحلان الكهربائي (SDS-PAGE) :

المبدأ : تعمل سلفات دوديسيل الصوديوم (SDS) على شحن جميع المواد البروتينة بشحنة ســالبة واحدة، وعلى أساس الكتلة الجزيئيّة النسبيّة لكلّ مكون من مكونات المــزيج البروتينــي، إذ تهــاجر البروتينات المنخفضة الكتل الجزيئيّة النسبيّة، بشكل أسرع من البروتينات عالية الكتل الجزيئيّة النسبيّة في هلامة عديد الأكريلاميد، و يجري الرحلان من القطب السالب باتجاه القطب الموجب.

المواد:

- رجّاج دائري (Orbital Shaker)، من شركة MUSUDA CORPORATION .
- جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) .
- مضخة لتفريغ الهواء.
- جهاز رحلان كهربائي PROTEAN-II XI cell من شركة Bio-Rad.
- واسمات بروتينية (Marker protein test mixture (6) for SDS- PAGE) شــركة Serva (Cat. No. : 39207, Lot No.:P080257)
- الحمض الأميني غلايســين (Glycine) ذو الصــيغة الكيميائيّــة $C2H5NO_2$ أو-$(NH_2\text{-}CH_2\text{-}COOH)$، الوزن الجزيئي = 75.07، شركة SCHARLAU .
- سلفات دودنيسيل الصوديوم (SODIUM DODECYL SULFFATE)، الصــيغة الكيميائيّــة CH3(CH2)11OSO3NA، PM= 288.38.
- بــس أكريلاميــد (N,N METHYLENE BIS - Acrylamid)، الصــيغة الكيميائيّــة: $C_7H_{10}N_2O_2$، PM = 154.2، شركة سيغما.
- أكريلاميد نقاوته 99.9% ، شركة BIO-RAD .
- كلوريد الصوديوم(Sodium Chloride) ، PM = 58.44.
- فوق سلفات الأمونيوم (Ammonium Peroxide Sulfate, APS).
- N,N,N,N-Tetra methyl-Ethylene Diamine، الصــــيغة الكيميائيّــــة $(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$، PM = 116.21، شركة WAKO .

- أزرق كومازي(Coomassie Blue- R250)، الصيغة الكيميائيّة $C_{45}H_{44}N_3O_7S_2$، USB
- تيميد (N.N.Ń, Ń-Tetramethylethylenedianmine, TEMED).
- بيتا ميركبتوايثانول (2-Mercaptoethanol)، الصيغة الكيميائيّة $HSCH_2CH_2OH$ ، PM = 78.14، شركة WAKO.
- أزرق بروموفينول (Bromophenol Blue)، الصيغة الكيميائيّة $C_{19}H_{10}Br_4O_5HS$ ، شركة HI MEDIA.

طريقة العمل:

استعمل جهاز الرحلان الكهربائي PROTEAN- II XI CELL بهدف فصل البروتينات المستضدية على أساس الوزن الجزيئي النسبي. نفذ ذلك في هلامة عديد الأكريلاميد (SDS-PAGE) وبتركيز قدره 12%، مع إضافة SDS بنسبة 1% وبسماكة 1.5 مم، حسب طريقة الموصوفة من قبل Smith (1994) مع بعض التعديلات، بإضافة الميركبتو ايثانول بيتا، لتحطيم الروابط الكبريتيّة (S-S)، ثم أجري الرحلان، وتمّ التلوين بأزرق كومازي R250، مدة ليلة كاملة، ثم إزالة اللون لاحقاً بمزيل اللون.

أ- تجهيز قالب الرحلان:

- غسلت الصفائح الزجاجيّة بالماء والصابون، ثم تركت لتجف، ثم مسحت بالكحول الايثيلي، وتركت حتى جفّت، واستعمل في أثناء ذلك القفازات، لتجنب تلوث الصفائح ببروتينات الجلد عن طريق اللمس، وبالتالي حدوث خطأ في أثناء قراءة النتيجة.
- جمعت الصفائح الزجاجيّة وبينهم الشرائط البلاستيكية بسماكة 1.5 مم التي حددت سماكة الجل، وثبتت بوساطة الملاقط، ثم ركب المشط في مكانه.
- ثبّت المشط الذي أخذت أسنانه ثخانة الجل بمقدار1.5مم وطول 1 سم وعرض 2–10مم، وبفاصل 3مم.
- وضعت علامة على الصفيحة الزجاجيّة على مسافة تبعد 2 سم من أسفل حافة أسنان المشط، ثم نزع المشط، وغطي القالب بالسلوفان لمنع وصول الغبار إليه.

ب- تحضير المحاليل : استخدم الماء المقطر منزوع الشوارد في تركيب المحاليل الأساسيّة القابلة للتخزين (Stock Solutions)، والتي فُلترت بأغشية واتمان (0.45 انغستروم) قبل

التخزين، أما المحاليل الباردة فقد استخرجت من مكان حفظها، وتركت 30- 60 دقيقـــة فـــي درجة حرارة الغرفة قبل استعمالها.

1. **محلول الأكريلاميد الأساسي (Stock solution Acrylamid) :**

وزنت الكميات الآتية:

- Acrylamid 30غ
- Bis Acrylamid 0.8غ

وحلّت في 80 مل ماء مقطر منزوع الشوارد، ثم أكمل الحجم إلى 100 مل ماء مقطر، وبعدها فلتّر المحلول، وحفظ في زجاجة بنيّة اللون في الدرجة +4°م حتى مدة شهر واحد، مع توخي الحذر من لمسه (محلول سام للأعصاب).

2. **دارئة هلامة الفصل (Stock separating gel Buffer).**

- وزنت 0.1 غرام من SDS و 45.5 غرام من التريس، ثم حلّت في 150 مل من الماء المقطـــر منزوع الشوارد.
- ضبطت درجة الباهاء إلى 8.8 باستعمال حمض كلور الماء ثم أكمل الحجم إلى 250 مل .
- حفظ المحلول في الدرجة +4°م لعدة أشهر.

3. **دارئة هلامة التكثيف (Stock Stacking gel):**

- وزنت 0.1 غرام من SDS و 15.1 غ من التريس، وحلّت في 150 مل من الماء المقطـــر منزوع الشوارد إلى أن تمّ الذوبان الكامل على الخلاط المغناطيسي.
- عدّلت الباهاء إلى الدرجة 6.8 بوساطة حمض كلور الماء .
- أكمل الحجم إلى 250 مل وحفظ في الدرجة +4°م لعدة شهور.
- تمّ التحقق من درجة الباهاء قبل كل استعمال.

4. **محلول فوق سلفات الأمونيوم الأساسي (10% Ammonium persulphate) :**

وزنت 0.1 غرام من فوق سلفات الأمونيوم(APS)، ثم أذيبت في 1 مل من المـــاء المقطـــر واستعملت بشكل طازج، حفظت في درجة حرارة +4°م لمدة لاتزيد على أسبوع.

5. **تحضير دارئة الرحلان (Reservoir Buffer):**

0.192 مول غلايسين و 0.025 مول من التريس و0.1% من SDS (حجم/حجم)

حيث حضر 3 ليتر كالآتي:

- 43.2غ غلايسين.
- 9.0غ تريس.
- 3.0غ SDS

ذوبت هذه المواد في ليترين من الماء المقطر المنزوع الشوارد، ثم أكمل الحجم إلى 3 ليتر، حيث كانت درجة الباهاء (pH =8.3) بدون تعديل، واستعملت هذه الدارئة طازجة .

6. دارئة تحضير العينة البروتينية.

مزجت المقادير الآتية:

- 0.92 غ من SDS.
- 2 مل بتا ميركبتو إيتانول، B-Mercapto-Ethanol .
- 4.0غ غليسيرول.
- 0.3 غ تريس.
- 2 مل بروموفينول 0.1% (Bromophenol) وزن/حجم، إذ حضر بحل 0.1 غ من صبغة البرومو فينول، في 10 مل من الماء المقطر.

- حلّت هذه المواد في أقل من 20 مل من الماء المقطر وضبطت الباهاء (pH=6.8)، بإضافة حمض كلور الماء، ثم أكمل الحجم بالماء المقطر إلى 20 مل، و تمّ التحقق من الباهاء قبل كلّ استعمال .
- وزعت الدارئة إلى أحجام متساوية في فيالات بلاستيكية مقاومة للتجميد(1.5 مل) وحفظت في الدرجة −20°م إلى حين الاستعمال.
- مزجت العينات البروتينيّة الحاوية على المستضدّات بنسبة حجم من العينة إلى 4 أحجام من دارئة العينة.
- تجدر الإشارة إلى أن التعرض لأوكسجين الهواء، مع مرور الزمن، يقلل من قوة الميركبتوإيتانول، بعد بضعة أسابيع .

7. تحضير الواسم البروتيني (Marker protein):

حلت العبوة بحيث يصبح التركيز 1 ملغ/مل في دارئة SDS-sample والتي تكون مكونة من 125 ميلي مول Tris-Hcl, pH 6.8 و2% SDS و 15% غليسيرول و 10 ميلي مول DTT و 0.025% أزرق بروم فينول(Brom Phenol Blue).

ثم قسمت إلى أجزاء متساوية في فيالات بلاستيكية مقاومة للتجميد وحفظت في الدرجة -20°م إلى حين الاستعمال.

8. تحضير صبغة كومازي:

مزجت المقادير الآتية:

❖ **أزرق كومازي R250**	**0.25 غ**
❖ **ميثانول.**	125مل
❖ **حمض الخل الثلجي**	25 مل
❖ **ماء مقطر**	100 مل

حلّت الصبغة بالميثانول أولاً، ثم أضيف حمض الخل الثلجي ثانياً، ثم الماء المقطر منزوع الشوارد. مع المحافظة على الترتيب من أجل الحصول على انحلال الصبغة بشكل جيد وكامل.

9. تحضير محلول إزالة اللون (Destaining solution):

استعمل المحلول المحضر حديثاً، ويتركب من المواد الآتية:

الميثانول	100مل
حمض الخل الثلجي Glacial Acetic Acid	100مل
ماء مقطر	800مل

10. تحضير هلامة الفصل بتركيز 12% (Separating gel):

أُخذت المواد الآتية في بيشر فلاسك.

- 15مل من محلول الأكريلاميد الأساسي تركيز 30% (Stock acrylamid solution).
- 10.5 مل من ماء مقطر.

تمّ التخلص من الغازات بوساطة مضخة تفريغ الهواء مدة 15 دقيقة، وذلك لكون الغازات تعيق عمليّة التكوثر، وتعمل على تشكيل فقاعات هوائيّة في أثناء عمليّة البلمرة ثم أضيفت المواد الآتية:

- 10.5 مل من محلول دارئة الفصل (Separating gel buffer solution).
- 45 ميكرو ليتر من 10% فوق سلفات الأمونيوم.
- 15 ميكروليتر من التيميد لتحفيز عملية البلمرة.

حُرِّك المحلول بلطف، ثم سكب مباشرة من البيشر على منتصف حافة الصفيحة الزجاجيّة، بعد أن ميّل قالب الرحلان، لينساب المحلول بين الصفائح الزجاجيّة بتأنٍّ شديد، حتى لايتشكّل فقاعات هوائيّة، واستمرت إضافة المحلول إلى أن وصل إلى العلامة التي تبعد نحو ا سم من حافة أسنان المشط. ثم أضيف 0.5 مل من الإيزوبروبانول بشكل لطيف باستعمال ماصة ميكروية، ولأن كثافة هذا الأخير تختلف عن كثافة محلول الهلامة، انتشر الايزوبروبانول على سطح الهلامة بدون اختلاط ، وتركت الهلامة حتى تكوثرت، عندها شوهد التباين بين الهلامة والايزوبروبانول وهذا يعتمد على درجة الحرارة.

11. تحضير هلامة التكثيف 7% (Stacking gel):

ريثما تتبلمر هلامة الاستفراد، حُضّرت هلامة التكثيف بإضافة المواد الآتية:

- 1.5 مل محلول الأكريلاميد الأساسي (Stock acrylamid solution).
- 6 مل ماء مقطر..

تمّ التخلص من الغازات بوساطة مضخة تفريغ الهواء مدة 15 دقيقة، ثم أضيف المواد الآتية:

- 2.5 مل محلول دارئة جل التكثيف (Stacking gel buffer solution).
- 15 ميكروليتر فوق سلفات الأمونيوم 10%.

عندما أصبحت هلامة الاستفراد (Separating gel) جاهزة، أزيل الايزوبروبانول الذي كان يغمر الهلامة، ثم غسل سطح الهلامة المتبلمرة بـ 2 مل من دارئة هلامة التكثيف للتخلص من آثار الايزوبروبانول. ثم أضيفت 5 ميكرو ليتر من التيميد إلى محلول هلامة التكثيف (Stacking gel).

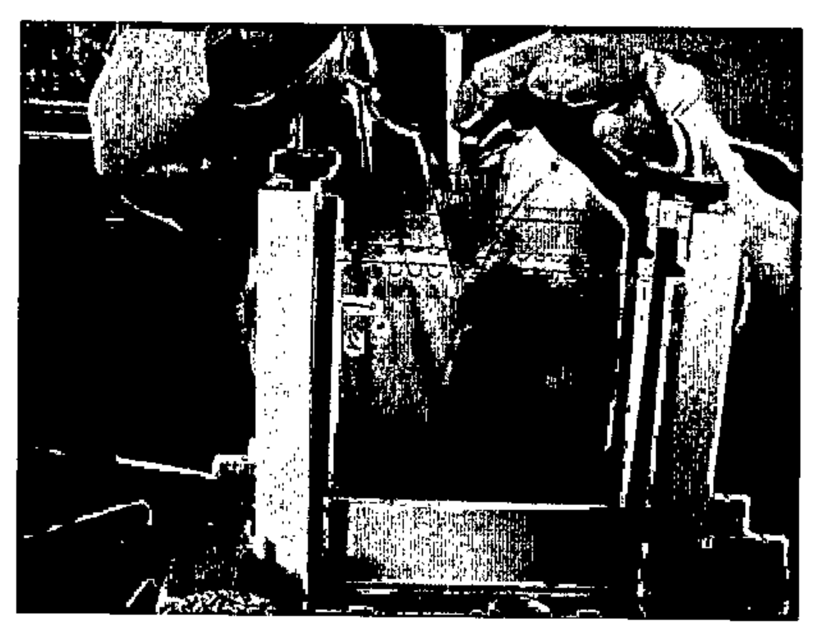
12. استبعدت تلك الكميّة التي غسلت بها، ثم سكب محلول هلامة التكثيف داخل القالب، حتى وصلت إلى حافة لوح الزجاج المقطوعة، ثم غمس المشط بشكل مائل، حتى لا تتشكّل فقاعات هوائيّة تحت أسنان المشط في أسفل الحفر، وتركت لتأخذ الحفر شكلها في الهلامة المتشكلة،

واستغرقت العمليّة نحو 30 دقيقة. بعدها نزع المشط بحذر شديد من هلامة التكثيف، و فكّ قالب الهلامة عن الحامل، كما أزيلت الشرائط العازلة (spacer) من أسفل قالب الهلامة، ووضع القالب في حوض الرحلان.

13. بعدها مُلئ الحوض العلوي بدارئة الرحلان (Stacking gel reservoir) حتى أعلى حافة الهلامة السفليّة، ومُلئت كامل الحفر بالدارئة قبل تحميل العينات. تمّت مراقبة مستوى محلول الدارئة في الحوض العلوي للتأكد من عدم تسريب المحلول ونقصه، ثم مُلئ حوض الرحلان السفلي بدارئة الرحلان، ومُيّل الجهاز كاملاً للتخلص من الفقاعات الهوائيّة المتشكّلة تحت حافة الهلامة السفلية في القالب الزجاجي.

ت- تحميل العينات(Loading of samples):

تمّ إيداع 30 ميكرو ليتر (مكل) من العينات المراد استفرادها في كلّ حفرة من حفر الجل باستعمال ميكروبايبت ورؤوس خاصة ذات نهاية طويلة ورفيعة، وذلك في منتصف الحفرة بالقرب من قاعها، كما تم إيداع واسم البروتين (Marker Protein) الحاوي على مزيج من البروتينات معروفة الكتل الجزيئيّة النسبية (الشكل14).

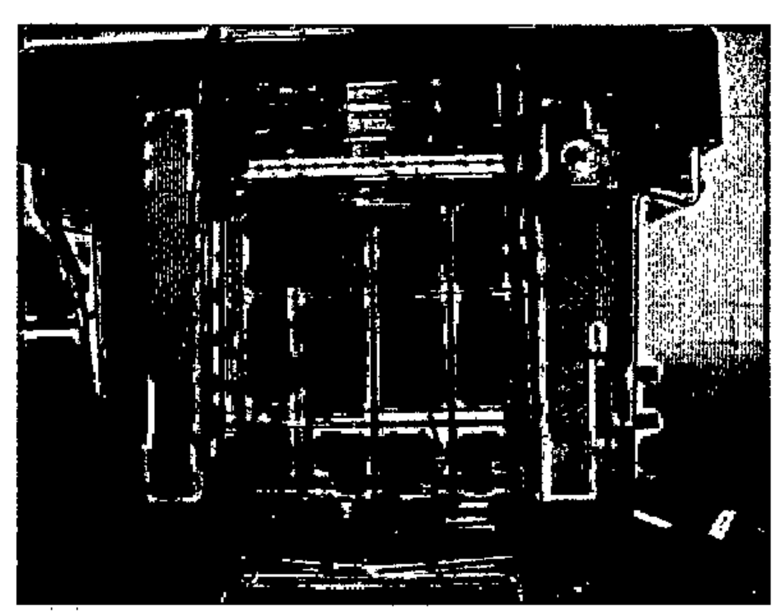


الشكل14. تحميل عينة البروتين في قاع حفر هلامة أكريلاميد التكثيف.

ث- نظام الطاقة وإجراء الرحلان:

- بدء العمل بوصل جهاز الرحلان بمنظم التيار الكهربائي، وطبق تيار أولي بشدة ثابتة قدرها 35 ميلي فولط، لمدة 30 دقيقة.

- تمّ التأكد من صحة عمل الجهاز وبدء الرحلان، وذلك بتشكّل حزمة حادة زرقاء اللـــون فـــي جـــل التكثيف، خلال الدقائق الأولى من عمل الجهاز (الشكل15).
- رفعت شدة التيار الكهربائي إلى 50 ميلي فولط، واستمرت طوال الليل هكذا حتّى نهاية الرحلان في اليوم التالي.
- استمر الرحلان حتى وصول أزرق البروموفينول إلى بعد 2 سم من حافة الهلامة السفليّة، عنـــدها قطع التيار الكهربائي.



الشكل15: فصل البروتينات في هلامة عديد الأكريلاميد بوساطة جهاز الرحلان الكهربائي.

فك قالب الرحلان وقطعت هلامة التكثيف وأزيلت ووضعت علامة على الجل واتجاه تحميل العينات ثم وضعت في صبغة كومازي، أما الهلامة الأخرى جهزت من أجل التبصيم المناعي.

ج- الصباغة:

وضعت هلامة الفصل في حوض يحتوي على كمية كافية من صـــبغة أزرق كومـــازي R250 المحضر حديثاً ثم وضع على الهزازة الكهربائية بحركات بطيئة مدة 4 ساعات على الأقل ويفضـــل أن تستمر الصباغة لمدة ليلية كاملة.

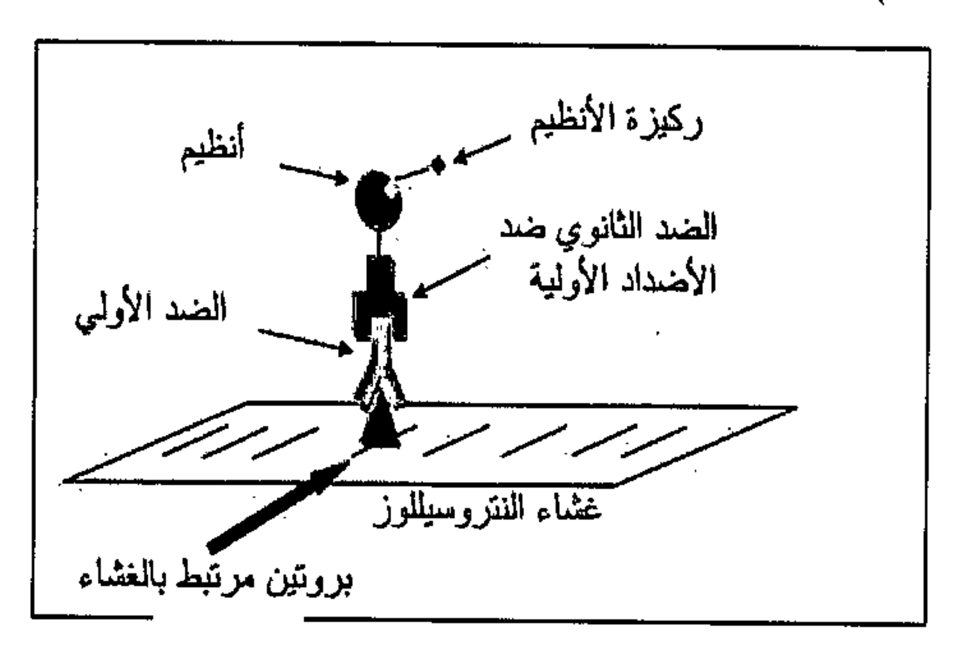
ح- إزالة اللون:

في اليوم الثاني تم التخلص من ملون أزرق كومازي و أستبدل بمحلول إزالـــة اللـــون. ظهـــرت العصائب البروتينية بشكل واضح، ومع تغيير المحلول من وقت لآخر، وبعد يومين من الغسيل تصبح الخلفية صافية وتظهر العصائب الضعيفة.

خامساً- الاختبارات والفحوصات:

1- **التبصيم المناعي (western blot):**

أ- **المبدأ:** يعتمد على نقل العصائب البروتينية من هلامة عديد الأكريلاميد إلى غشاء النتروسيللوز بتأثير القوة الكهربائي من القطب السالب إلى القطب الموجب. تستخدم هذه التقانة لتحديد هوية البروتينات بالاعتماد على قدرتها على ربط أضداد نوعية وبهذه الطريقة يمكن التحري عن بروتين ما ضمن مزيج من البروتينات باستعمال الضد النوعي لهذا البروتين. تفصل البروتينات بوساطة الرحلان الكهربائي ثم تنقل إلى غشاء نتروسيللوزي، ويحضن الغشاء مع أضداد أولية نوعية ضد البروتين الهدف. تضاف أضداد ثانوية تكون موسومة بالإنظيم مثل إنزيم الفوسفاتاز، ثم يحدث التفاعل الإنظيمي في موضع الارتباط بعد إضافة الركيزة الملائمة (الشكل16).



الشكل16. مخطط يبين مراحل إظهار البروتينات بعد نقلها إلى الغشاء.

المواد:

- ركيزة TMB (3.3',5,5'-tetramethylbenzidine): liquid substrate system (for membranes, product No.: T0565 (SIGMA).
- أضداد ضد غلوبلينات الأرنب محضرة في الماعز ومقترنة بأنزيم البيروكسيداز Peroxidase – labeled affinity purified antibody to rabbit IgG (H+L) (produced in goat, Cat. No.:074- 1506) شركة KPL.

حضرت الصبغات والمحاليل الآتية:

- **0.1%صبغة الأميدوبلاك (Amido Black):**

(10% حمض الخل، 45% ميتانول).

ولتحضير هذا الملون وزنت 0.2 غ من مسحوق Buffalo Black ، وأضيفت له 90 مل ميتانول، و 20 مل حمض خل ثلجي، و 90 مل من الماء المقطر المنزوع الشوارد.

- **محلول إزالة صبغة الأميدوبلاك (Amido Black Destain):**

(2% حمض خل، 45% ميتانول)

225 مل ميتانول و 10 مل حمض الخل الثلجي.

- **الدارئة الملحيّة الفوسفاتيّة (0.15 PBS)، (pH, 7.2):**

وزنت المواد الآتية:

المادة	غ/ل
NaCl	8
KCl	0.2
$Na_2Hpo_4.12H_2O$	2.89
KH_2po_4	0.2

ثم حلّت في 800 مل من الماء المقطر، وحرك المزيج جيداً حتى تمام الانحلال، ثم أستكمل الحجم بالماء المقطر إلى 1000 مل، وضبطت الباهاء (pH) بإضافة حمض كلور الماء (1 N)، ثم عقمت في التعقيم الرطب (Autoclave) في الدرجة 120° م مدة 20 دقيقة.

- **محلول 3% ألبومين مصل البقر(3%BSA)**

يحضر بحل 3 غ من ألبومين مصل البقر في 100 مل من دارئة TBST أو في 100 مل من دارئة PBS-T .

- **دارئة TBST:**

(10 ميلي مول Tris-HCl، 0.15 مول NaCl، 8 ميلي مول Sodium azide ، 0.05% -tween 20، pH=8.0).

لتحضير ليتر واحد وزنت المواد الآتية:

المادة الكيميائية	الكمية
تريس	1.21 غ
NaCl	8.76 غ
NaN_3	0.5 غ

حلت المواد في 800 مل من الماء المقطر منزوع الشوارد ، ثم ضبطت pH إلى الدرجة 8.0 بإضافة بضع قطرات من حمض كلور الماء، ثم أضيف 500 مكل من توين-20 (Tween-20)، ثم أكمل الحجم بالماء المقطر المنزوع الشوارد وحفظت في درجة الحرارة +4°م إلى حين الاستعمال.

دارئة PBS-T:

حضرت بإضافة 0.5 مل من توين- 20 إلى 1000 مل من دارئة الفوسفات الملحيّة (PBS).

محلول حمض كلور الماء 1 نظامي:

حضر من محلول تجاري تركيزه 37% ، والوزن الجزيئي 36.46 ، ورقم الحموضة يساوي 1 ، والكثافة النوعية 1.18 وذلك بإضافة 86 مل من حمض كلور الماء إلى لتر واحد من الماء المقطر ثم يوضع في زجاجة وتغلق.

دارئة النقل (Wet blot Transfer Buffers)

تتكون هذه الدارئة من 25 ميلي مول Tris-HCl، و 0.2 مول Glycine، و 20% Methanol.

- تريس 9.8 غ
- غلايسين 43.24غ
- ميتانول 600 مل
- يكمل الحجم بالماء المقطر حتى 3 ليتر.

يتألف التبصيم المناعي من مرحلتين وهما:

1- نقل البروتينات إلى غشاء النتروسللوز:

طريقة العمل:

بعد الانتهاء من الرحلان الكهربائي للبروتينات على هلامة عديد الأكريلاميد، يؤخذ ويصبغ أحدهما، فأما الجل الآخر فقد نقع وغشاء النتروسيللوز(Nitrocellulose membrane) في دارئة النقل لمدة أقل من 15 دقيقة بهدف إزالة الأملاح ومنظّفات الرحلان الكهربائي. واستخدم لكل جل وسادتي ليف، واثنتان من ورق ترشيح (Trans-blot, Bio-Rad, No. 1703956) في دارئة النقل، ورتبت بدءاً من الجانب الرمادي للقالب وفق الآتي:

- وسادة ليف.
- ورق ترشيح واتمان.
- الهلامة الحاملة للبروتينات المستفردة.
- غشاء نتروسيللوز.
- ورق ترشيح واتمان.
- وسادة ليف.

- كرّر هذا الترتيب مع قالب ثاني للجل الآخر، عندما كان ذلك مطلوباً.
- وضع القالب في داخل حوض التبصيم في المكان المخصص له، بحيث يكون الجانب الرمادي للقالب بمقابل الجانب الرمادي لوحدة القطب الكهربائي لحوض التبصيم أي جانب القطب السالب بحيث يكون الترحيل من الجل إلى الغشاء. لذا كان من المهم دوما التأكد من الاتجاه الصحيح.
- وضعت قطعة مغناطيسية في قاع حوض التبصيم، بعدئذ وضع الحوض على الخلاط المغناطيسي على السرعة الوسطى، ووصلت وحدة التبريد بالجليد في حوض الدارئة (في درجة حرارة −20°م)، وفي بعض الحالات تم تبريد دارئة التبصيم إلى الدرجة +4°م.
- ملأ الحوض بدارئة نقل التبصيم الرطب حتى الحافة السفلية للصف الأعلى من فتحات القالب.
- وصلت الأقطاب الكهربائية بوحدة التغذية الكهربائية، وتم تمرير تيار كهربائي شدته 100 فولت مدة ساعة و نصف.

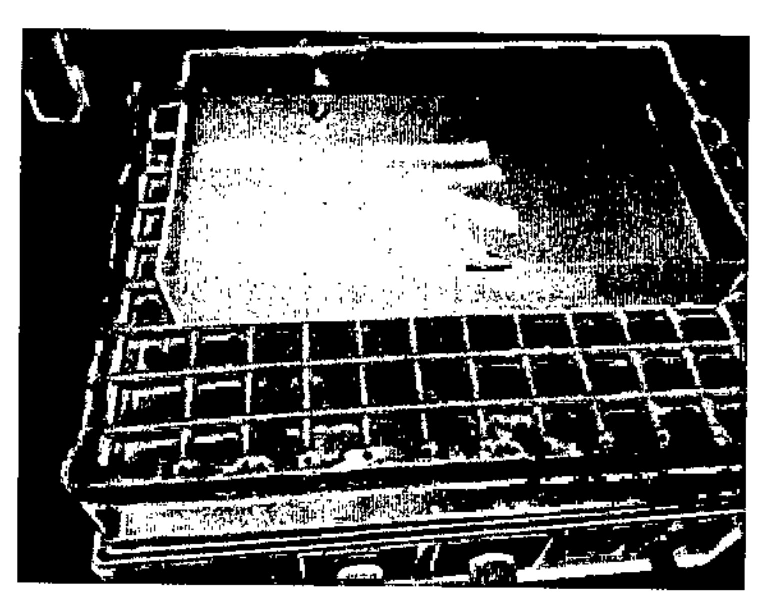
صباغة غشاء النتروسيللوز:

إذ إن الغاية منها هي إظهار العصائب البروتينية المنقولة على غشاء النتروسيللوز للتأكد من صحة النقل، كما أنه أيضاً دليل من أجل قص الغشاء إلى شرائط.

طريقة العمل: صبغ الغشاء بصبغة الأميدوبلاك 0.1% لمدة دقيقة واحدة، ثم شطفت أربع مـــرات بالماء المقطر المنزوع الشوارد وذلك من أجل واسمات الأوزان الجزيئية. وصـــبغت الأغشـيّة فـــي حالات أخرى بأحمر بونسو وذلك بهدف التأكد من عملية النقل، حيث يمكن إزالة هذا الملون ليحضـــن الغشاء مع الأضداد الأولية.

2- الكشف عن المستضدات على أغشية النتروسيللوز:

غسلت الشرائط بالدارئة الملحيّة الفوسفاتيّة PBS-T (pH, 7.2)، ثم أقفلت المواقع المستضـــدية اللانوعية بنقع الأغشيّة في دارئة TBST – NFM 5% مدة ساعة في درجة حرارة 37مْ أو في درجة حرارة +4°م طوال الليل وكان الأفضل وهي تهتز على الرجاجة بسرعة ثابتة (الشكل17) .



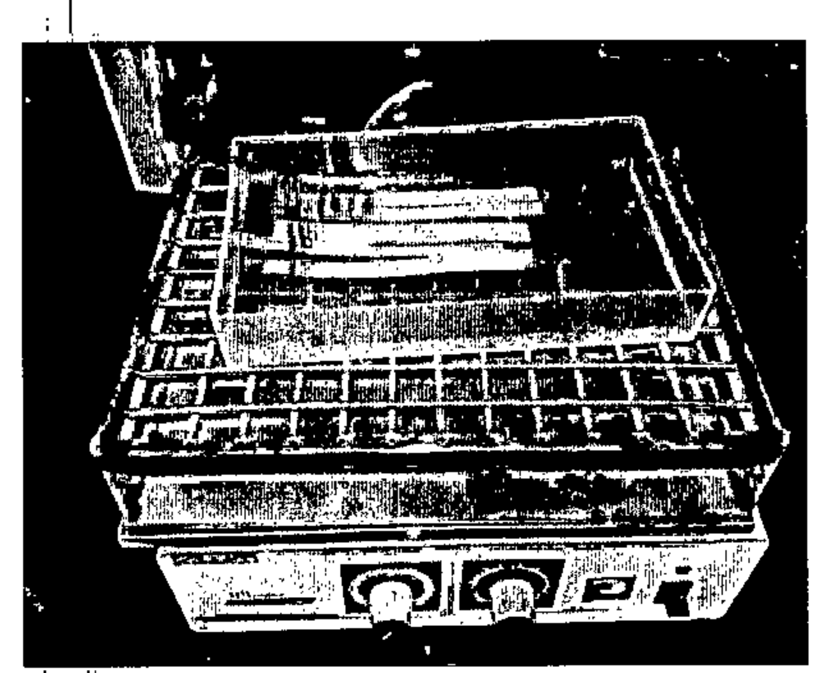
الشكل17. مرحلة حضن شرائط النتروسيللوز في دارئة TBST-NFM 3% على الهزاز الأفقي.

تجدر بالإشارة إلى أنه في بعض الحالات حفظت الأغشيّة في دارئة TBST في درجـــة حـــرارة +4°م لمدة أقصاها أسبوع، وفي حالات أخرى نشفت تماماً، ثم حفظت في التجميد العميق إلى حين الاستعمال بعد أن غلفت بالسيلوفان وكتب عليها المعلومات.

- أزيل محلول الإقفال (Blocking solution)، ثم شطفت بدارئة الغسيلTBST لمرة واحدة.
- أضيفت 40 مل عينة المصل التي تحتوي على الأضداد الأولية(الشـــاهد الايجـــابي) المخفّـــف في TBST-1% BSA أو TBST- 3% NFM، فقد كان التمديد المثالي للمصل هو 1:5000

وذلك من خلال سلسلة من التجارب، ثم حضنت في درجة حرارة الغرفة مدة ساعة بينما تهتز بشكل ثابت.

- غسلت أربع مرات ولمدة خمس دقائق لكلّ مرة في دارئة TBST في درجة حرارة الغرفة على الهزاز (الشكل18).
- أضيفت 500 مكل من الأضداد الثانوية الموسومة بإنظيم البيروكسيداز بتمديد قدره 1:10000 في TBST + 3 % NFM الذي حصل عليه بسلسلة من التجارب، وحضنت مدة ساعة في درجة حرارة الغرفة على الهزاز.
- غسلت أغشية النتروسيللوز 4 مرات مدة خمس دقائق لكل غسلة في دارئة TBST في درجة حرارة الغرفة. أضيفت 500 مكل من الركيزة TMB ، فظهرت العصائب خلال 15 دقيقة. وتمت المراقبة بعناية وذلك لأن مدة التفاعل متفاوتة، إلى أن أصبحت واضحة بشكل جيد.



الشكل18. مرحلة غسل شرائط النتروسيللوز في الدارئة على الهزاز.

- أوقف التفاعل بشطف الأغشيّة بالماء المقطر منزوع الشوارد.
- صبغ شريط واسم بروتين بـمحلول صبغة الأميدوبلاك (Amido Black %0.1) مدة دقيقة واحدة، ثم أزيل الصباغ وأضيف فوراً محلول مزيل الصبغة (Amido Black destain) مدة 10 ثواني تقريباً، ثم شطف بالماء المقطر.

2- اختبار الاليزا النقطية (Dot-ELISA) أو التبصيم المناعي النقطي (Dot-blot):

نفذت كما وصفت من قبل Swarna و Parija (2008) مع بعض التعديلات، بحيث استخدمت الأمصال وحيدة النوعية لتحت وحدات السائل العُداري الكبدي (27، 38، 54 كيلودالتون) التي حصل عليها من الأرانب ، والمستضدات الكلية للديدان المدروسة (الدودة المتورقة الكبدية، الشريطية تيسانيزية، الشريطية المونيزية اكسبانزا ، الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة).

المواد:

Goat anti rabbit IgG-Conjucated HRP (KPL, No. 074-1506)-

TMB,3,3,5,5 tetramethylbenzidine,Sigma No. T0565 ركيزة لونية

- غشاء نتروسيللوز قطر 0.45 أنغستروم.

طريقة العمل:

- قطعت غشاء النتروسيللوز إلى مربعات طول ضلعها 0.5 سم.
- وضع 3 ميكروليتر من المستضد تركيزه 1مكل/مل والذي يمثل الخلاصة البروتينية من كل طفيلي مدروس على كل مربع من غشاء النتروسيللوز وتركت مدة 30 دقيقة حتى جفت.
- غسلت المربعات بدارئة TBST مدة خمس دقائق.
- أغلقت المواقع اللانوعية بغمر قصاصات الأغشيّة في دارئة 5% TBST-NFM مدة ساعة في درجة حرارة الغرفة على الهزاز.
- غسلت الأغشيّة بدارئة TBST مدة خمس دقائق ثلاث مرات.
- حضنت الأغشية مع أمصال الأرانب الممنعة بالمستضدات 27، 38، 54 كيلودالتون المددة في TBST- NFM 3% بنسبة 1:2000(حصل عليها بإجراء سلسلة من التجارب) مدة ساعة في درجة حرارة الغرفة على الهزاز.
- غسلت الأغشيّة بدارئة TBST مدة خمس دقائق ثلاث مرات.
- مددت الأضداد الثانوية المقترنة بالإنظيم حتى 1:10000 في TBST- NFM 3% (حصل عليها بإجراء سلسلة من التجارب)، وحضنت مدة ساعة في درجة حرارة الغرفة على الهزاز.
- غسلت الأغشيّة بدارئة TBST مدة خمس دقائق ثلاث مرات.
- أزيل الماء ووضعت الركيزة TMB وتمت مراقبة تطور اللون في النقاط الايجابية حيث يتشكل لون أزرق.

3- اختبارات المقايسة المناعية المقترنـــة بـــالإنظيم(Enzyme Linked Immunosorbent Assay):

نفذت وفقاً للطرائق الموصوفة من قبل Crowther (2009) مع إجراء بعض التعديلات.

المواد:

- أطباق اليزا خاصـــة: صـــفيحة تتكـــون مـــن 96 حفـــرة شـــركة Flow laboratory (Cat.No.76-381-04- lot No 0031233).
- ميكروبايبت 0-20، 20-200، 200-1000 مكل.
- قارئ اليزا أوتوماتيكي (Automated microplate Elisa reader).
- 0.1 مول من دارئة كربونات/ بيكربونات pH=9.6.
- أضداد ثانوية للأرانب مقترنة بإنظيم البيروكسيداز مضادة لأضداد الأغنام (Rabbit anti – sheep IgG (h+I) HRP. Lot No.:3-).
- أضداد ثانوية مقترنة بإنظيم الفوسفاتاز القلوي مضادة لأضداد الأغنـــام (Anti – sheep IgG, whole molecule - Alkaline phosphatase conjugate product, No.: A5187, SIGMA).
- ركيزة (pNPP microwell substrate system, catalog No. : 50-80-00) شركة KPL.
- ركيزة (Sure Blue –TMB microwell peroxidase substrate,1 component, catalog No.:52-00-002) شركة KPL.
- Tween-20 (Cat. No.:39796, Lot No.: 070801) شركة سيرافا.
- ميكروبايبت متعدد الرؤوس (Multichaned pipette) بحجم 300 مكل.
- مقياس باهاء (pH) الكتروني.
- ماء منزوع الشوارد.

<u>تحضير دارئة الكربونات /بيكربونات الصوديوم:</u>

- وزنت 10.6 غ من كربونات الصوديوم (Na_2Co_3) وحلّت في 800 مل من المـــاء منـــزوع الشوارد وبعد تمام الانحلال أكمل الحجم إلى 1000 مل، ثم غطي بسدادة وحفظ فـــي الدرجـــة +4°م.

- حضرت محلول بيكربونات الصوديوم بوزن 8.4 غ من بيكربونات الصوديوم ($NaHCO_3$) في 800 مل من الماء المقطر منزوع الشوارد والمعقم وبعد تمام الذوبان أكمل الحجم إلى 1000مل، ثم وضع في قارورة وأغلقت بسدادة فلينية ثم حفظت في درجة الحرارة +4°م.
- مزجت 29.3 مل من محلول كربونات الصوديوم مع 70.7 مل من محلول بيكربونات الصوديوم ($NaHCO_3$)، ثم ضبطت درجة الباهاء على 9.6، مع الانتباه إلى أن محلول البيكربونات غير ثابت ولا يحفظ لمدة أكثر من أسبوع.
- حضرت 0.5 مول من دارئة PBS-Tween-20 من محلول دارئة الفوسفات الملحيّة (Phosphate Buffered Saline, pH 7.2)، على الشكل الآتي:

وزنت المواد الآتية:

NaCl	8 غ
KCl	0.2 غ
Na_2HPO_4	1.15 غ
KH_2PO_4	0.2 غ

ذوبت جميعها في 800 مل من الماء المقطر منزوع الشوارد ثم ضبط الـ pH ، 7.2، وأكمل الحجم إلى1000 مل ضمن قارورة ذات غطاء بلاستيكي (Screw cap) ثم عقمت في الصاد الموصدة (Autoclave) مدة 15 دقيقة في الدرجة 120° م، وبعد التبريد أضيفت إليها 0.5 مل من توين-20.

- استعملت أضداد مقترنة بإنظيم الفوسفاتاز القلوية أوبيروكسيداز الفجل (Coating Enzyme-Alkaline Phosphatase conjugated IgG (conjugate Antibody مضاد بشكل نوعي لأضداد الغنم أو Horseradish Peroxidase (من مصدر تجاري).
- استعملت الركيزة الملائمة(TMB أوpNPT).

1- معايرة المصل باستعمال المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم المباشرة:

مبدأ التفاعل: هو أن الأضداد الأولية تربط على سطح حفر الطبق ثم أضداد ثانوية مقترنة بالإنظيم تفاعلت بوجود ركيزة ($I- Ag_w + Ab^{*E}$ W +S-------- Read) (الشكل19).

Ag_w: أضداد مصل الغنم مدمصة على الحفر.

Ab^{*E}: أضداد غنمية مقترنة بالإنظيم.

S : الركيزة أي الملون.

W: غسيل الحفر بدارئة الفوسفات الملحيّة 4 مرات.

+: إضافة الوسيط والحضن في الدرجة 37°م مدة ساعة.

I: حفر الطبق، المرحلة الصلبة (Solid phase).

الشكل19. معايرة الأضداد الأولية بالمقياسة المناعية المقترنة بالإنظيم المباشرة.

المحاليل:

دارئة كربونات / بيكربونات الصوديوم (0.05M carbonate /bicarbonate buffer, pH, 9.6).

محلول التمديد (Dilution solution) :

(PBS-1% BSA, 0.05% Tween-20): حضر من دارئة الفوسفات الملحيّة مضافاً إليها توين−20 بنسبة 0.05% وألبومين مصل البقر (BSA) بنسبة 1%.

محلول الغسيل(Washing solution) :

حضرت من دارئة الفوسفات الملحيّة بإضافة توين−20 بنسبة 0.05%.

دارئة الإقفال (blocking buffer):

حضرت بإضافة 3 غ من ألبومين مصل البقر إلى 100 مل من محلول الغسيل (PBS-T) .

طريقة العمل:

- وضع طبق (plate) الاليزا بحيث يكون الحرف A في الزاوية العلوية اليسارية. مثلت الأرقام بالأعمدة، بينما مثلت الأحرف بالأسطر على الطبق.
- جهزت 11 أنبوب زجاجي بحيث وضع في الأنبوب الأول 2 مل من دارئة الكربونات.
- مددت أمصال الأغنام (الشاهد الايجابي) في دارئة الكربونات/ بيكربونات، وذلك وفق الآتي:
  - أخذت 11 أنبوب اختبار زجاجي حجم 5 مل، ثم حضرت تمديدات المصل في 2مل من دارئة الكربونات/ بيكربونات وفق الآتي: التمديد 1:50 وضعت في الأنبوب الأول والتمديد 1:100 في الانبوب الثاني، و 1:200 في الأنبوب الثالث، والتمديد 1:400 في الأنبوب الرابع، 1:800 في الأنبوب الخامس، والتمديد 1:1600 في الأنبوب السادس، والتمديد 1:3200 في الأنبوب السابع، والتمديد 1:6400 في الأنبوب الثامن، والتمديد 1:12800 في الأنبوب التاسع، والتمديد 1:25600 في الأنبوب العاشر، والتمديد 1:51200 في الأنبوب رقم 11.
  - رجت الأنابيب بشكل دائري ومنتظم باستخدام جهاز Vortex .

- نقل 100 مكل من الأنبوب الأول ذو التمديد 1:50 إلى كل حفرة من الحفر A إلى H في العمود الأول على طبق الاليزا، ثم من الأنبوب الثاني ذو التمديد 1:100 إلى العمود الثاني، وهكذا وصولاً إلى الأنبوب 11 أما حفر العمود 12 من طبق الاليزا تركت فارغة من A إلى H.
- غطي الطبق بصفيحة سيلوفان وتركت في درجة الحرارة 37°م مدة ساعة، ثم وضعت في درجة الحرارة +4°م مدة 24 ساعة، وذلك لكي تتاح الفرصة لارتباط الأضداد الأولية على جدار الحفر.
- في اليوم التالي أزيلت محتويات الحفر في الطبق، ثم أضيفت 300 مل من دارئة الغسيل (PBS-T)، وترك الطبق مدة 5 دقائق ثم التخلص من دارئة الغسيل، وكررت العملية 4 مرات بفاصل زمني 5 دقائق.
- أضيفت إلى كل حفرة 300 مكل من محلول الإقفال، ثم غطي الطبق بالسلوفان وترك في درجة الحرارة +4°م طوال الليل.
- في اليوم التالي تمّ التخلص من محلول الإقفال وغسل الطبق 4 مرات بدارئة الغسيل بفاصل زمني خمس دقائق.
- حضرت الأضداد الثانوية المقترنة بإنظيم البيروكسيداز وفق الآتي:

- حضرت تمديدات الضد الثانوي في 2 مل من دارئة العينة (PBST-BSA 1%) وفق الآتي: التمديد 1:2000 وضعت في الأنبوب الأول والتمديد 1:4000 في الأنبوب الثاني، و 1:8000 في الأنبوب الثالث، والتمديد 1:16000 في الأنبوب الرابع، 1:32000 في الأنبوب الخامس، والتمديد 1:6400 في الأنبوب السادس، والتمديد 1:128000 في الأنبوب السابع، والتمديد 1:256000 في الأنبوب الثامن.
- رجت جميع الأنابيب باستعمال جهاز Vortex للحصول على مزج نظامي غير عشوائي.

- نقل 100 مكل من الأنبوب الأول إلى كل حفرة من حفر الصف A(1−12) حتى العمود 12، وهكذا من الأنبوب الثاني إلى حفر الصف B(1−12)، وصولاً إلى الأنبوب الثامن حيث وضع 100مكل في كل حفرة من حفر الصف H(1−12).
- غطي الطبق وحضن في الدرجة 37°م مدة ساعة.
- تم التخلص من محلول الضد الثانوي بغسل الطبق كما ذكر سابقاً.
- أضيف 100 مكل من ركيزة TMB إلى كل حفرة من حفر الطبق وغطيت ثم تركت في درجة حرارة الغرفة مدة 10 دقائق ثم أوقف التفاعل بإضافة 100 مكل من محلول الإيقاف إلى كل حفرة.
- لوحظ تشكل لون أزرق في الحفر التي حدث فيها تفاعل، أما الحفر التي لم يحدث فيها تفاعل فبقيت صافية وعند إضافة محلول الإيقاف انقلب إلى اللون الأصفر.
- تمت القراءة باستعمال قارئ الاليزا على طول موجة قدرها 450 نانومتر.
- مثلت القراءات بيانياً ونوقشت النتائج، إذ أخذ اللوغاريتم العشري لتمديد الضد الأولي، تم اختيار النقطة المثالية لتمديد الأضداد الأولية والأضداد الثانوية المقترنة بالإنظيم (الشكل21).

2- معاير المستضد بالمقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة:

تمثل بهذه العلاقة ($I- Ag_w + Ab_w + Anti- Ab^{*E}$ W +S-------- Read).

Ag_w: مستضد الكيسات العدارية الملتصق على الحفر.

Ab: أضداد أولية غنمية ضد مستضدات الكيسات العدارية.

$Anti\text{-}Ab^{*E}$: أضداد ثانوية مقترنة بالإنظيم.

S : الركيزة أي الملون.

W : غسيل الحفر بدارئة الفوسفات الملحيّة 4 مرات.

+: إضافة الوسيط والحضن في الدرجة 37°م مدة ساعة.

طريقة العمل:

1- يمدد المستضد في طبق الاليزا، وذلك من العمود1 إلى العمود11 بدارئة الكربونات/بيكربونات الصوديوم، ويترك العمود 12 فارغاً بحيث يحتوي على دارئة الكربونات/بيكربونات الصوديوم فقط(الشكل20).

2- يغطى الطبق ويحضن في الدرجة +4°م مدة 24 ساعة.

3- يوضع 400 مكل من دارئة القفل (PBST-BSA3%) في كل حفرة وتحضن مدة ساعتين.

4- يوضع 100 مكل من أمصال الأغنام المصابة بداء الكيسات العدارية في كل حفرة من حفر الطبق.

5- تمدد الأضداد الثانوية المقترنة بالإنظيم وتوضع 100 مكل من كل تمديد في حفر الصفوف من A وحتى G فقط، دون الصفH التي يضاف اليها دارئة التمديد فقط (الشكل).

بحيث تكون التمديدات على الشكل الآتي: حفر الصف A (1:500)، والصفB (1:1000)، والصفC (1:2000)، والصفD (1:4000)، والصفE (1:8000)، والصفF (1:16000)، والصف G(1:32000).

الشكل20. معاير المستضد بالمقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة.

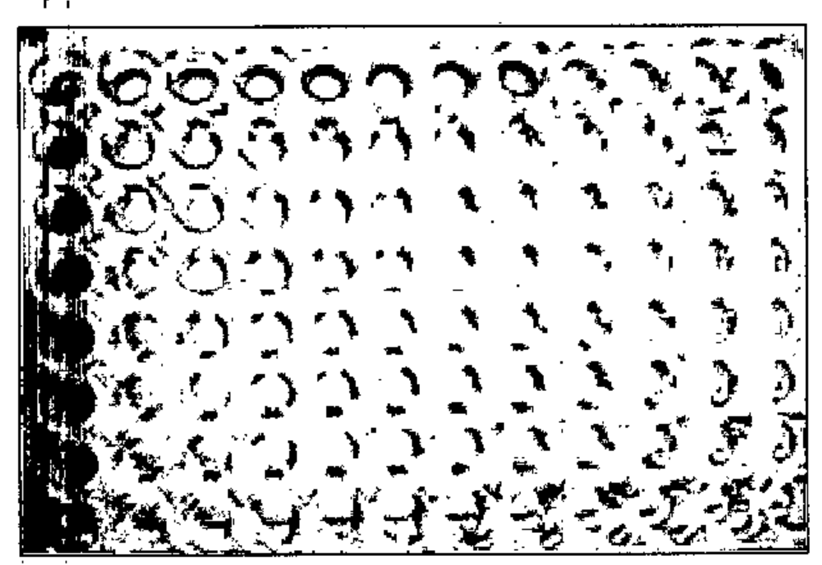
6- يغطى الطبق، ويحضن في الدرجة 37°م مدة ساعة.

7- تفصل كل مرحلة من المراحل السابقة بغسيل الطبق بدارئة الغسيل (PBST) ثلاث مرات بفاصل زمني 5 دقيقة.

8- يوضع في كل حفرة 100 مكل من الركيزة اللونية، وتحضن في درجة حرارة الغرفة مدة 10 دقيقة حيث يظهر التغير اللوني (الشكل21).

9- يوقف التفاعل بإضافة 50 مل من محلول الإيقاف وتقرأ النتيجة في قارئ الاليزا على طول موجة قدرها 540 نانومتر.

10- مثلت القراءات بيانياً ونوقشت النتائج، إذ أخذ اللوغاريتم العشري لتركيز المستضد.

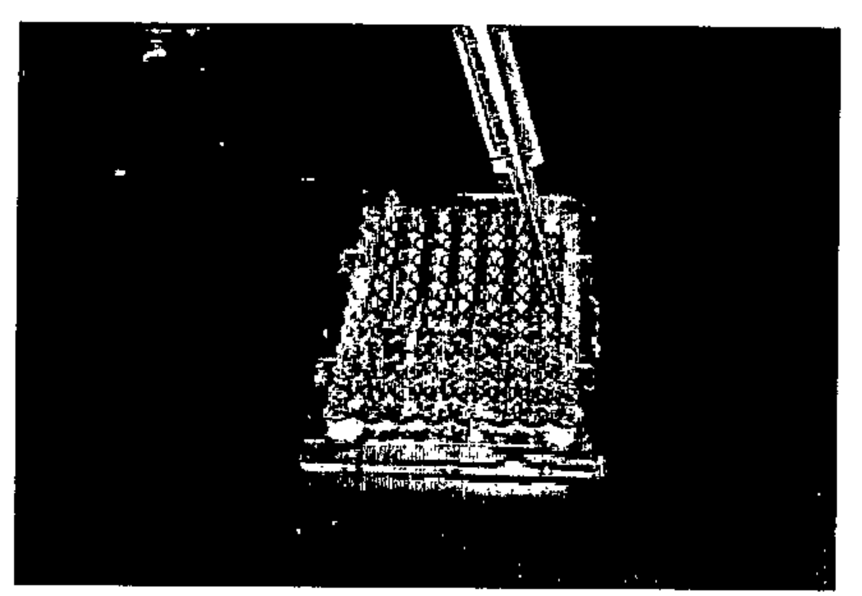


الشكل21. تطور اللون وحدوث التفاعل بطريقة رقعة الشطرنج لتحديد التمديد المثالي لتفاعل الأضداد الثانوية والمستضد.

3- المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة (Indirect ELISA):

طريقة العمل:

1- أضيفت 100 ميكروليتر من المستضد الممدد (1.2 ميكروغرام /مل في 0.1 مول دارئة كربونات / بيكربونات الصوديوم (pH, 9.6) في كل حفرة ثم غطيت الصفيحة بالسيلوفان وحضنت في درجة +4°م طوال الليل(الشكل22). ويجدر الإشارة إلى أن المستضد المستخدم هو بروتينات القمة الأولى للسائل العداري الكبدي المستفردة بالسيفادكس G-100.



الشكل22. تبطين الحفر بالمستضد في أطباق الاليزا وامتزاز المستضد.

2- بعد 24 ساعة أزيل محلول المستضد المبطن (Coating antigen)، وغسلت ثلاث مرات بدارئة الغسيل (PBS-Tween-20, pH,7.2).

3- أضيفت إلى كل حفرة 300 مكل من محلول الإقفال (Blocking solution)، ثم غطيت الصفيحة بالسلوفان وتركت في درجة الحرارة +4°م طوال الليل.

4- أزيلت محتويات الطبق، ثم غسل ثلاث مرات بدارئة الغسيل بفاصل زمني 5 دقائق.

5- أضفيت 100 مكل من عينات أمصال الأغنام بتمديد 1:400 إلى الحفر بثلاث مكررات.

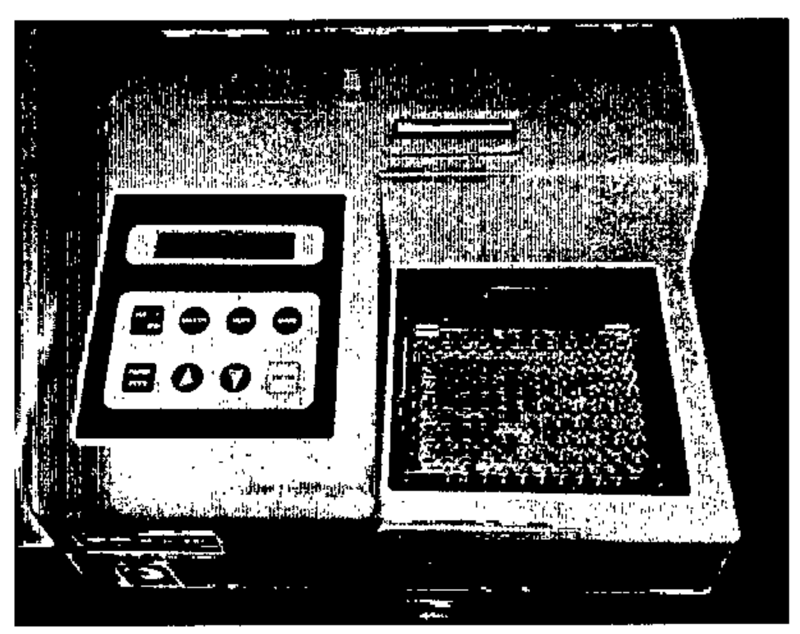
6- استخدمت دارئة PBS-Tween كشاهد سلبي (NC)، وكذلك استخدم مصل حملان حديثة الولادة قبل رضاعة السرسوب (خالية من الأضداد) كشاهد سلبي، ثم غطيت الصفيحة وحضنت في الدرجة 37°م مدة ساعة، وذلك بغية إتاحة الفرصة لربط المستضدات الأضداد المغلقة للصفيحة (Ab-Coated plate).

7- أفرغ الطبق من محتوياته ثم غسل بدارئة الغسيل. ثم أضيفت 100 ميكروليتر من الأضداد المقترنة بالإنظيم (1:8000) لكل حفرة. ثم غطيت الصفيحة وحضنت في درجة حرارة 37°م مدة 60 دقيقة.

8- أفرغت الصفيحة وغسلت، ثم أضفيت 100 ميكروليتر من الركيزة TMB، ثم غطيت الصفيحة وحضنت في درجة حرارة الغرفة مدة 30 دقيقة.

9- بعد ظهور تطور اللون إشارة إلى حصول التفاعل أوقف التفاعل بعد 10 دقائق من إضافة الركيزة في درجة حرارة الغرفة بإضافة 100 ميكروليتر من حمض كلور الماء 1 نظامي إلى كل حفرة.

10- سجلت الكثافة الضوئية على طول موجة 450 نانومتر باستعمال قارئ الاليزا (الشكل23).



الشكل23. قراءة الكثافة الضوئية في قارئ الاليزا.

ثامناً- تحضير المستضدات المفصولة في هلامة عديد الأكريلاميد.

تم الحصول على مستضدات السائل العُداري الكبدي المفصولة في الجل، بإتباع الخطوات الآتية:

1. صبغت الهلامة بعد انتهاء الرحلان الكهربائي بالتحريك الجيد وبلطف في محلول أزرق كومازي مدة 30 دقيقة فقط، ثم غسلت بمحلول إزالة اللون عدة مرات مدة 30-45 دقيقة لإزالة الصبغة جزئياً بهدف إظهار العصائب بشكل بسيط.
2. غمرت الهلامة بلطف في محلول غلوتارألدهيد 2% مدة 40-60 دقيقة، بهدف المساعدة على ارتباط العصائب البروتينية بالهلامة وتقليل الفقدان الجزئي للبروتينات في عمليات الغسل اللاحقة بمحلول إزالة اللون.
3. وضعت الهلامة على لوحة زجاجية شفافة وقطعت العصائب المطلوبة (وهي العصائب ذات الكتل 54، 27،38 كيلودالتون) باستخدام شفرة حادة، ثم وضعت في أسفل أنبوب مثقلة بلاستيكي أبندروف، ثم جمدت وحفظت في الدرجة -20°م.
4. تم تحضير المستضدات للحقن باستعمال عدد من العصائب 54 كليودالتون، وذلك بهرسها في عن طريق إمرارها بسرنغ حجم 20 مل من خلال إبرة قياس 18، وكررت العملية عدة مرات، ثم أضيفت إليها10 مل من الدارئة الملحيّة الفوسفاتيّة(pH,7.2)، ثم مررت من خلال إبرة قياس 22 إلى أن أصبح المزيج متجانساً، وقدر حجم المحلول وتركيز المستضد وحفظ في التجميد العميق إلى حين الاستعمال. كررت العملية نفسها مع المستضدات 38 و 27 كيلودالتون.

تاسعاً: تمنيع الأرانب (Hyperimmune antisera):

ويهدف ذلك إلى إنتاج أمصال وحيدة النوعية في الأرانب للمستضدات البروتينية والببتيدية المفصولة في هلامة عديد الأكريلاميد.

طريقة العمل:

اختيرت ست أرانب خالية من الأمراض تزن نحو 500 غ تقريباً وهي بصحة جيدة وذات نشاط عال. وضعت علامات مميزة لكل منها لتمييز المعاملات التي نفذت على كل أرنب. وضعت الأرانب في الحجر الصحي مدة أسبوعين في أقفاص حظيرة الأرانب وقدمت لها الماء والأعلاف الخضراء والمركزة لمدة أسبوعين(الشكل24).





الشكل24. رعاية أرانب التجربة في أقفاص خاصة وتنفيذ الحجر الصحي.

قسمت الأرانب إلى ثلاث مجموعات، حيث حقنت المجموعة الأولى بالمستضد 54 كيلودالتون، والمجموعة الثانية حقنت بالمستضد38 كيلودالتون، والمجوعة الثالثة حقنت بالمستضد 27 كيلودالون (الشكل25).

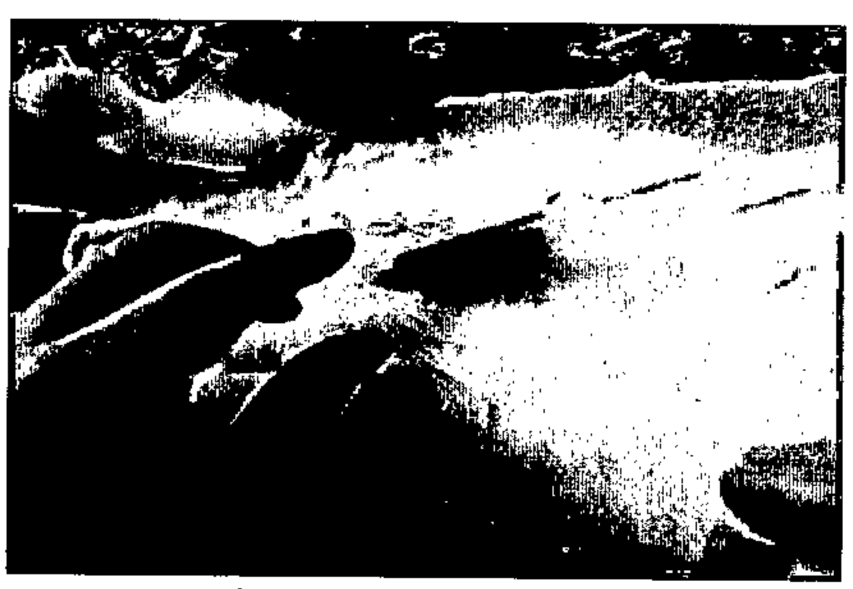



الشكل25 . حقن الأرانب بمعلق المستضد تحت الجلد في منطقة الأكتاف في مواقع متعددة للعصائب المعزولة.

مدد المستضد المولد للمناعة إلى 0.8 مل بمحلول سالين المعقم، ثم مزجت بإضافة 0.25 مل من مساعد فروند الناقص (Incomplete Freund's Adjuvant, IFA) إلى أن شكل مستحلب ثابت، ثم زرقت تحت جلد الأرنب في المنطقة حول الأكتاف و/أو في أدمة الجلد في الورك الخلفي قرب الأطراف الخلفية لمرة أو مرتان في حالة الحقن داخل أدمة الجلد بشكل أعظمي وهي موضحة في الجدول2، وعزز بدوره الاستجابة المناعية من خلال العرض المستدام للمستضد المولد للمناعة.

جمع عينات الدم :

جمعت عينات الدم من شريان الأذن المركزي ومن القلب مباشرة (الشكل26) بوساطة إبرة قياس 21، وترك الدم في درجة حرارة الغرفة طوال الليل ليتخثر وينفصل المصل، ثم نبذت العينات بسرعة قدرها 2500 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة.



الشكل 26. جمع الدم من القلب مباشرة من أرانب التجربة.

الجدول2. برنامج تمنيع الأرانب والحصول على الأمصال وحيدة النوعية.

اليوم 0	**سحبت عينات الدم قبل التمنيع نحو 15-20 مل، وذلك قبل الحقن لتشكل عينات شاهد سلبي للأضداد النوعية. ثم حقن كل أرنب بجرعة مستضد نحو 100-200 مكغ تحت الجلد، وفي عدة أماكن، بما يعادل1 مل من مستخلب المستضد.**
اليوم 14	**حقنت الأرانب بنحو 50-100مكغ من المستضد مع مساعد فروند الناقص تحت الجلد بما يعادل 500 مكل من المستضد.**
اليوم 28	**حقنت الأرانب بنحو 50-100مكغ من المستضد مع مساعد فروند الناقص تحت الجلد.**
اليوم 42	**سحب نحو 3-5 مل من الدم، ثم فحص للكشف عن تشكل الأضداد.**
اليوم 56	**حقنت الأرنب بنحو 25-50 مكغ من المستضد مع مساعد فروند الناقص تحت الجلد بما يعادل 250 مكل من محلول المستضد.**
اليوم 70	**جمع نحو 3-5 مل من الدم، ثم أعيد الجمع كل 28 يوماً.**
اليوم 72	**نقلت عينات الدم إلى المختبر ليتم فحص المصل.**
اليوم 84	**حقنت الأرانب بـنحو25 إلى 50 مكل من المستضد مع مساعد فروند الناقص تحت الجلد وثم أعيد الحقن كل 28 يوم .**

عاشراً- المؤشرات الإحصائية المدروسة لتقييم اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة :

استعملت بعض المؤشرات لتقييم اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم للمستضد المستفرد بالمقارنة مع الحيوانات المصابة عيانياً (شاهدا إيجابياً) وكذلك مع الحيوانات غير المصابة عيانياً (شاهداً سلبياً) إذ يعد الفحص العياني طريقة تشخيصيّة معياريّة لإثبات الإصابة بالكيسات العُدَاريّة، ومن هذه المؤشرات :

1- **الحساسيّة (Sensitivity):**

هي نسبة الحيوانات التي تمّ التعرف عليها بأنها مصابة بداء الكيسات العُدَاريّة عن طريق الكشف عن الأضداد النوعيّة للمستضد المستفرد والنقي في أمصال الحيوانات المصابة فعلاً بالكيسات العُدَاريّة، وذلك بوساطة اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة. ويحسب من المعادلة الآتية:

$$DS=TP/(TP+FN)\times 100$$

TP: الايجابي الحقيقي.

FN: السلبي الكاذب.

2- **النوعيّة (Specificity):**

هي نسبة الحيوانات التي تمّ التعرف على تشخيصها بأنها غير مصابة بداء الكيسات العُدَاريّة نظراً لعدم وجود أضداد نوعيّة لداء الكيسات العُدَاريّة في أمصال الحيوانات غير المصابة بشكل فعليّ(عيانياً). ويحسب من المعادلة الآتية:

$$DSP=TN/(TN+FP)\times 100$$

TN: السلبي الحقيقي.

FP: الايجابي الكاذب.

3- **التفاعلات التصالبيّة:**

هي نسبة الحيوانات التي تمّ التعرف على تشخيصها بأنها غير مصابة بالكيسات العُدَاريّة ولكنها مصابة بأنواع أخرى من الديدان والأطوار اليرقيّة مثل الإصابة بالكيسة المذنبة دقيقة الرقبة، عن طريق الكشف عن الأضداد غير النوعيّة للمستضد المستفرد والنقي في أمصال الحيوانات بوساطة اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم وتحسب وفق المعادلة الآتية:

$$(TPw)/(TPw+FNw)\times 100$$

TPw: عدد الحالات الايجابية الحقيقية بالاختبار لأضداد الدودة المدورسة.

FNw: عدد الحالات السلبية الكاذبة بالاختبار لأضداد الدودة المدروسة.

4- قيمة التنبؤ الايجابي (positive predictive value):

تحدد نسبة الحالات الايجابية الحقيقية من عدد الحالات الايجابية بالاختبار الكاشف ويرمز له بالرمز PPV أو +PV وتحسب من المعادلة الآتية:

$$PPV= (P\times DS)/ (P\times DS+ (100-P) \times (100-DSP)) \times 100$$

DS: قيمة الحساسيّة.

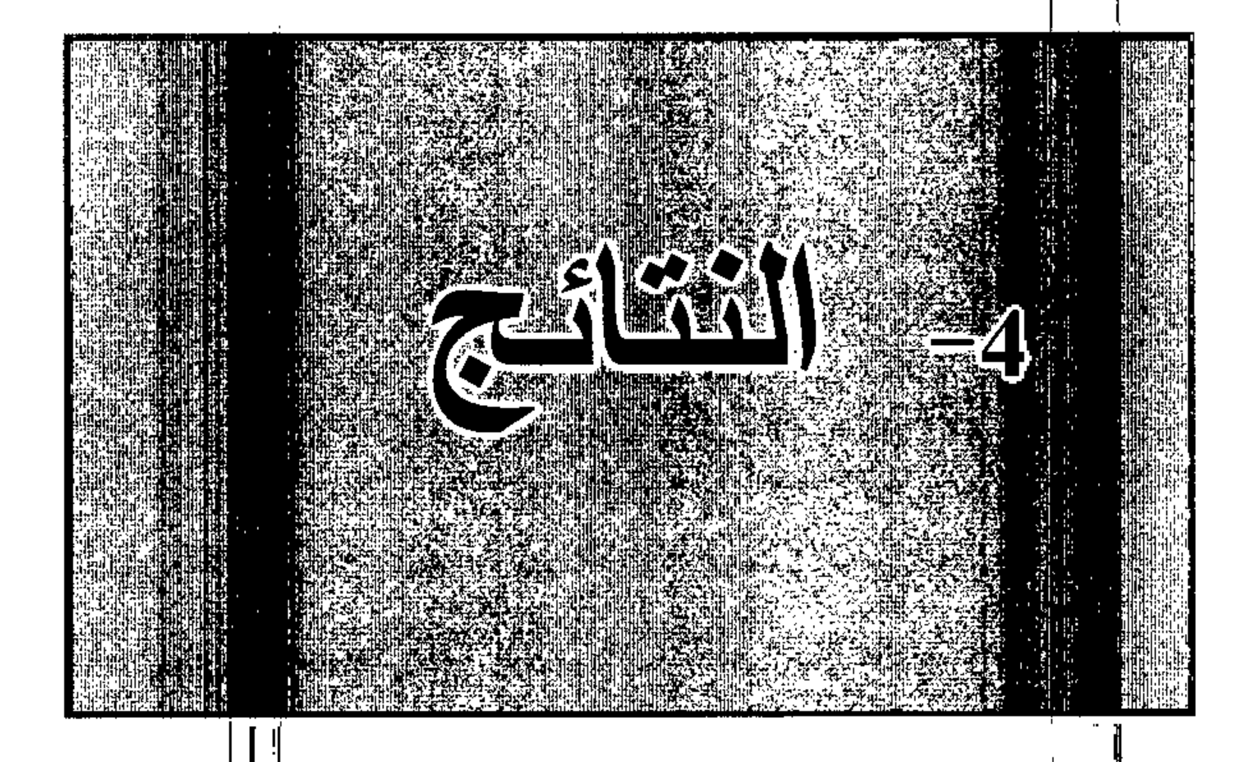
P : نسبة انتشار المرض.

5- قيمة التنبؤ السلبي (negative predictive value):

ويمثل عدد الحالات السلبية الحقيقية من عدد الحالات السلبية الكلية في الاختبار الكاشف ويرمز له بالرمز NPV أو -PV. وتحسب من المعادلة الآتية:

$$NPV= (DSP\times (100-P))/(DSP \times (100-P) +(100-DS)\times P) \times 100$$

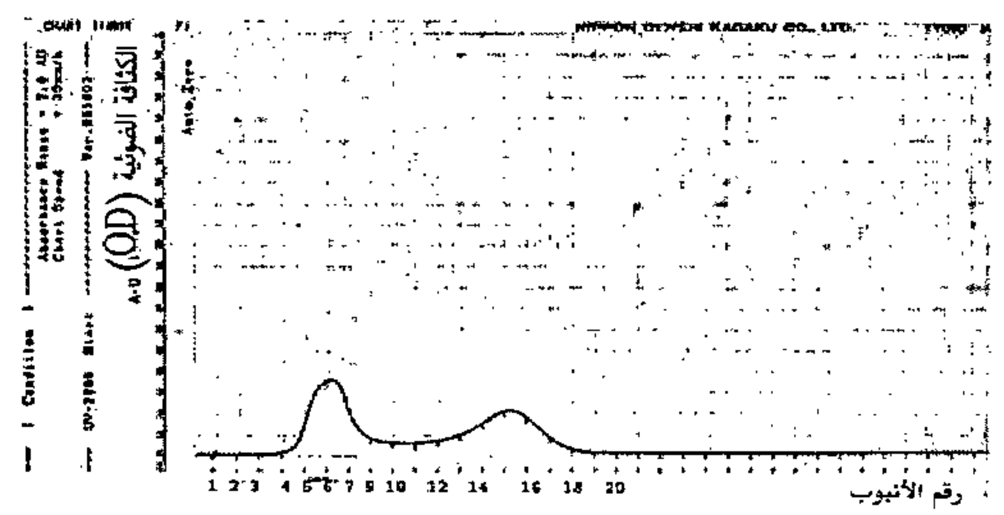
DSP: قيمة النوعية.


4- النتائج

تمت تنقية مستخلص البروتينات بطريقة الاستفراد والتثفيل والديلزة ثم فصلت بالرحلان الكهربائي في هلامة عديد الأكريلاميد في الشروط المخفضة، ثم حددت العصائب ذات الفاعليـــة المستضـــدية بتقنية التبصيم المناعي وأمصال مرجعية نوعية للكيسات العُذَارِيّة ، ثم حضرت الأمصـــال وحيـــدة النوعية عن طريق تمنيع الأرانب ثم حددت التفاعلات التصالبية مع مستضدات الديدان المدروســـة، وأخيراً قيم اختبار المقايسة المناعية المقترن بالإنظيم باستعمال مستضدات السائل العُـــداري وكانـــت النتائج وفق الآتي:

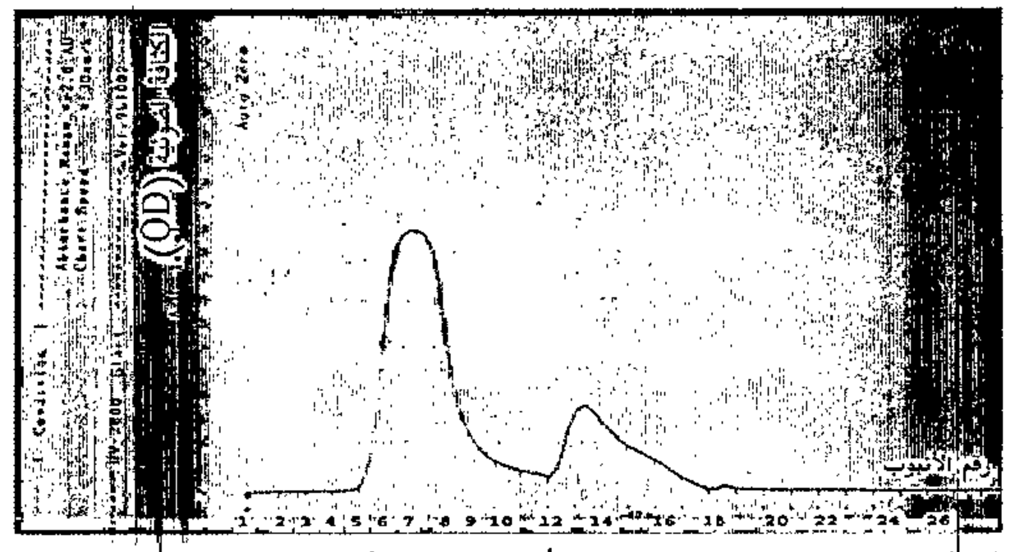
أولاً: الاستفراد(Separation):

أوضحت نتائج استفراد بروتينات السائل العُداري الكبدي في عمود السيفادكس G-100 بسرعة تدفق 3مل/أنبوب/10دقيقة بأنه تشكلت قمتين، حيث توزعت بروتينات القمة الأولى في الأنابيب 4 إلى 9 والثانية في الأنابيب 12 إلى 17 (الشكل27).



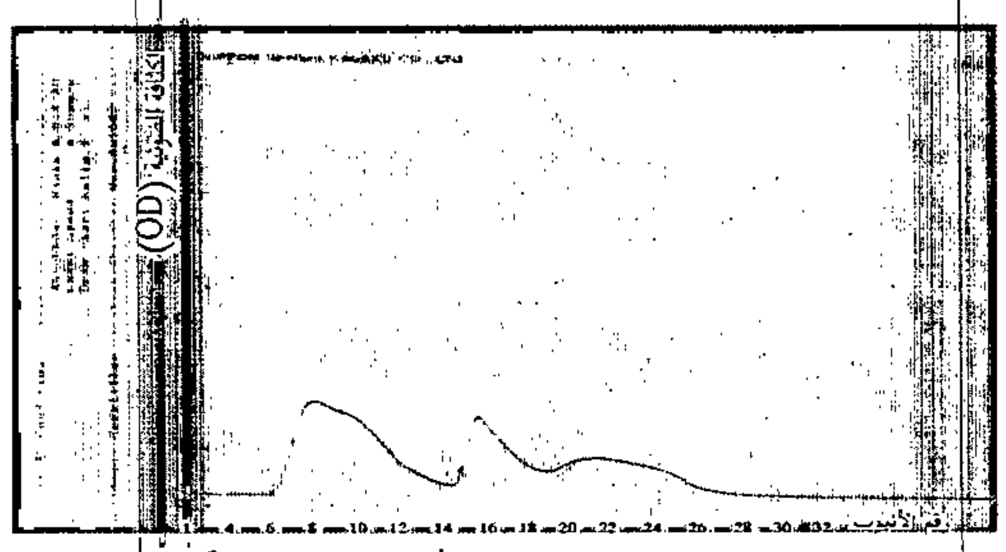
الشكل27. استفراد بروتينات السائل العُداري الكبدي في عمود السيفادكسG-100 .

أما في استفراد بروتينات السائل العُداري الرئوي في عمود السيفادكس G-100 فقد تشكلت أيضاً قمتين واضحتين، حيث توزعت بروتينات القمة الأولى في الأنابيب من 5 إلى 9، والثانية في الأنابيب من 11 إلى 17، (الشكل28).



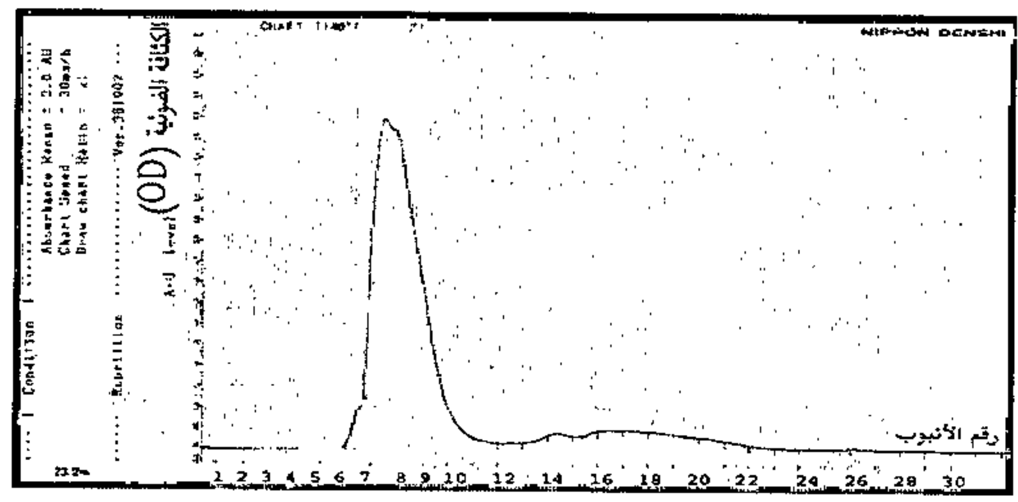
الشكل28. استفراد بروتينات السائل العُداري الرئوي في عمود السيفادكس G-100 .

أما أثناء استفراد بروتينات الكيسة العُدَارِيّة الرئوية الكاملة في الإصابة المفردة في عمود السيفادكس G-100 بسرعة تدفق 3مل/أنبوب/10دقيقة، فقد ظهرت ثلاثة قمم واضحة، حيث توزعت بروتينات القمة الأولى في الأنابيب من 6 إلى 13، والثانية في الأنابيب من 15 إلى 18، والثالثة في الأنابيب 20 إلى 25 (الشكل29).



الشكل29. استفراد بروتينات السائل العُداري الرئوي للعينة المفردة الكاملة في عمود السيفادكس G-100 .

كما تمّ تجزئة بروتينات الشريطية المونيزية اكسبانزا في عمود الســيفادكس G-100 وبســرعة 3مل/أنبوب/10 دقائق، حيث أوضحت وجود قمتين، وكانت الأولى أهمها ، حيــث توزعــت بــين الأنبوب رقم 6 والأنبوب رقم10 والثانية بين الأنبوب رقم 13 والأنبوب رقم 22 (الشكل30).



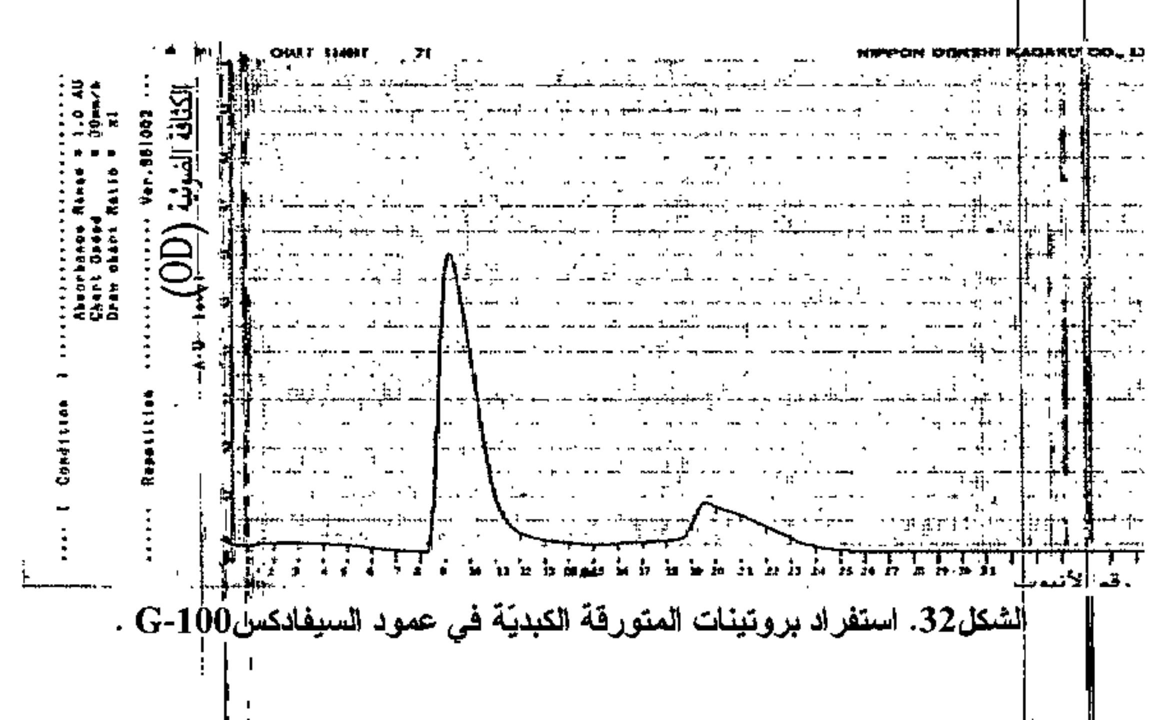
الشكل30. استفراد بروتينات الشريطية المونيزية اكسبانزا في عمود السيفادكسG-100 .

كما تشكلت قمتين من خلال استفراد بروتينات الشريطية تيسانيزية في عمود السيفادكس G-100 بسرعة تدفق 3مل/أنبوب/10دقيقة، فكانت القمة الأولى هي القمة الرئيسية حيث توزعت بروتيناتــه المجزئة بين الأنبوب رقم8 والأنبوب رقم 16 والثانيــة بــين العمــود رقــم 17 والأنبــوب رقــم 26(الشكل31).



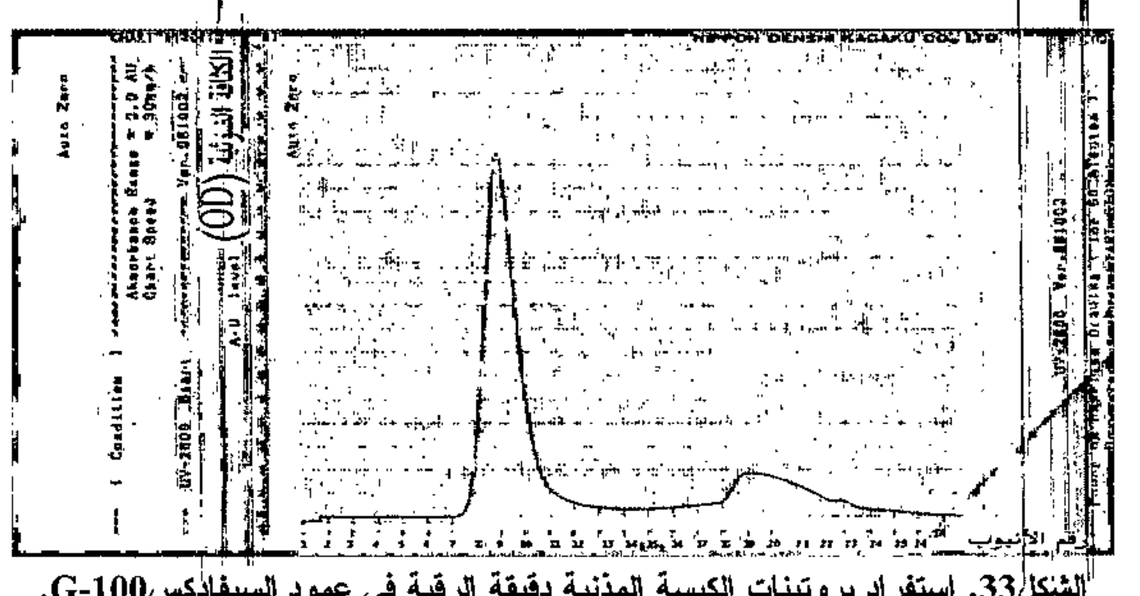
الشكل31. استفراد بروتينات الشريطية تيسانيزية في عمود السيفادكس G-100 .

بينما توزعت بروتينات مستخلص الدودة المتورقة الكبدية الكاملة في عمود السيفادكس G-100 بسرعة تدفق 3مل/أنبوب/10دقيقة في قمتين كانت الأولى هي الأكبر، حيث توزعت بين الأنبوب رقم8 والأنبوب رقم13، بينما توزعت بروتينات القمة الثانية بين الأنبوب 16 و24 (الشكل32).



الشكل32. استفراد بروتينات المتورقة الكبديّة في عمود السيفادكس**G-100** .

أما نتائج استفراد مستخلص الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة الكاملة فتجزأت بروتيناتها في قمتين. فقد توزعت بروتينات القمة الأولى بين الأنبوب 7 والأنبوب 12، أما القمة الثانية فتوزعت بين الأنبوب 15 والأنبوب 26 (الشكل33).

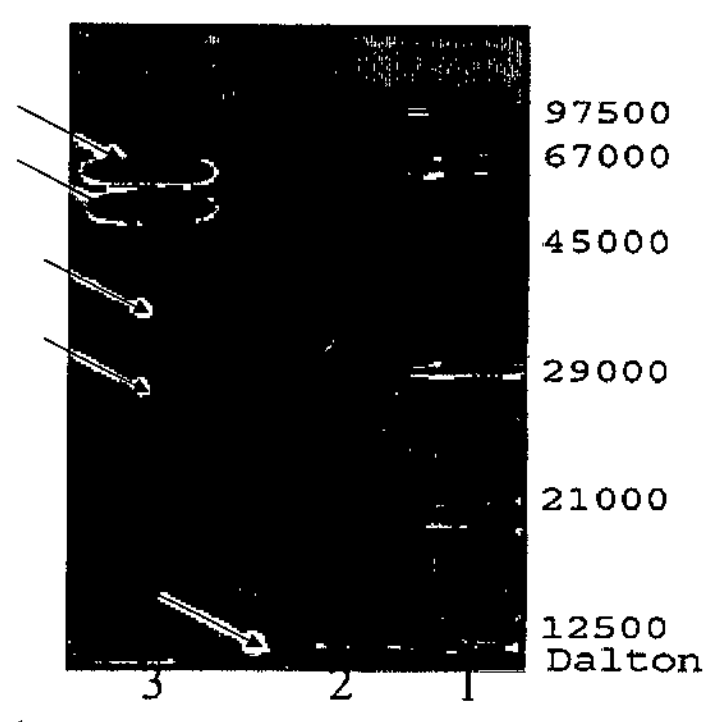


الشكل33. استفراد بروتينات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة في عمود السيفادكس**G-100**.

ثانياً: فصل البروتينات في الرحلان الكهربائي (SDS-PAGE)

أ- فصل بروتينات السائل العُداري الكبدي.

لقد تشكلت خمس عصائب نتيجة لفصل بروتينات السائل العُداري الكبدي في الشروط المخفضة في هلامة عديد الأكريلاميد ذات التركيز 12% وباستعمال صبغة كومازي R250، وكانت كتلها الجزيئيّة النسبية 67 ، 54، 38، 27 و 16 كيلودالتون (الشكلين 34 و38).



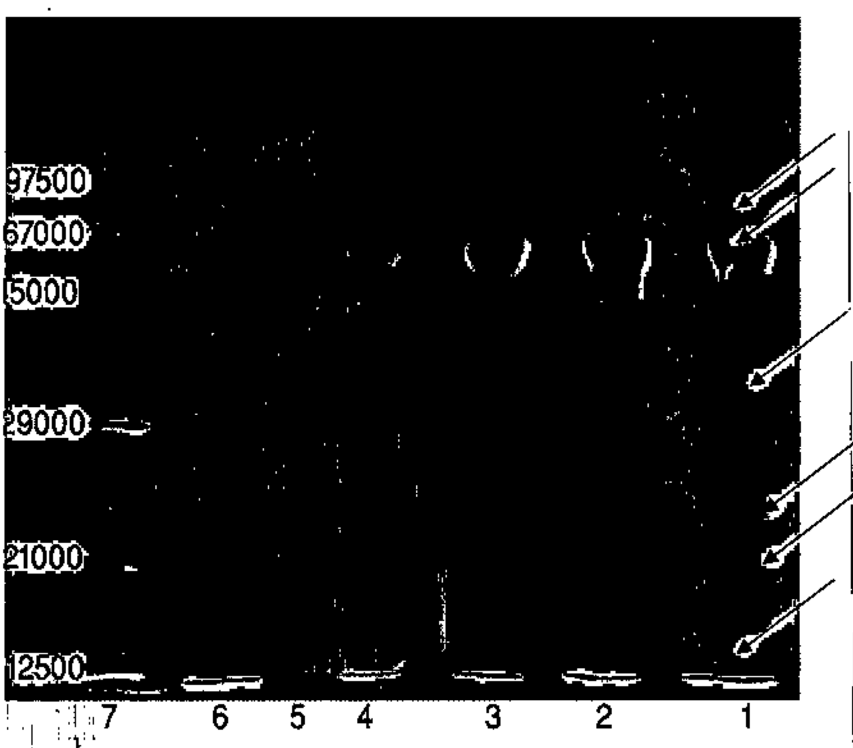
الشكل34. فصل بروتينات السائل العُداري الكبدي المزدوج في هلامة عديد الأكريلاميد، تركيز 12%، صبغة أزرق كومازي R250. 1: واسم البروتين، 2 : سائل عداري من القمة الثانية المستفردة في هلامة السيفادكس، 3: سائل عداري من القمة الأولى المستفردة في هلامة السيفادكس

ب- فصل بروتينات السائل العُداري الرئوي.

تشكلت ست عصائب نتيجة لفصل بروتينات السائل العُداري الرئوي في الشروط المخفضة في هلامة عديد الأكريلاميد وكانت كتلها الجزيئيّة النسبية: 67 ، 54، 38، 27، 22 و 12 كيلودالتون (الشكل35).

وبذلك تطابقت مع السائل العُداري الكبدي في أربع عصائب (67، 54، 38، 27 كيلودالتون) بينما غابت العصابتين 22، 12 كيلودالتون في السائل العُداري الكبدي.

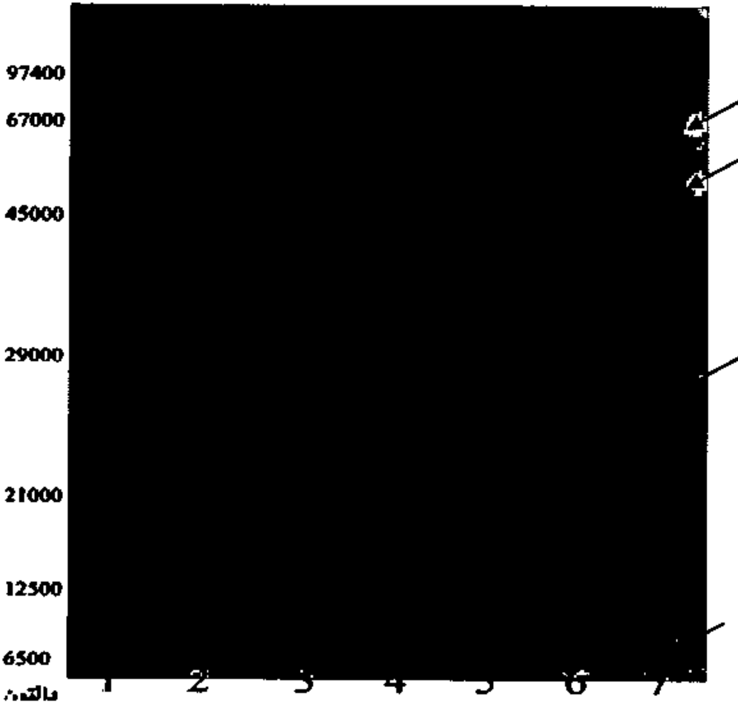
وتمثل الأعمدة 1 من إلى 7 بروتينات القمة الأولى والثانية للسائل العداري الرئوي لدى تجزئتها في عمود السيفادكس.



الشكل35. فصل بروتينات السائل العُداري الرئوي المزدوج في هلامة عديد الأكريلاميد، تركيز 12%، صبغة أزرق كومازي R250، الأعمدة من1 إلى 6 تمثل بروتينات السائل العداري الرئوي المستفردة في السيفادكس (القمة الأولى والثانية)، 7: واسم البروتين.

ت- فصل مستخلص بروتينات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة:

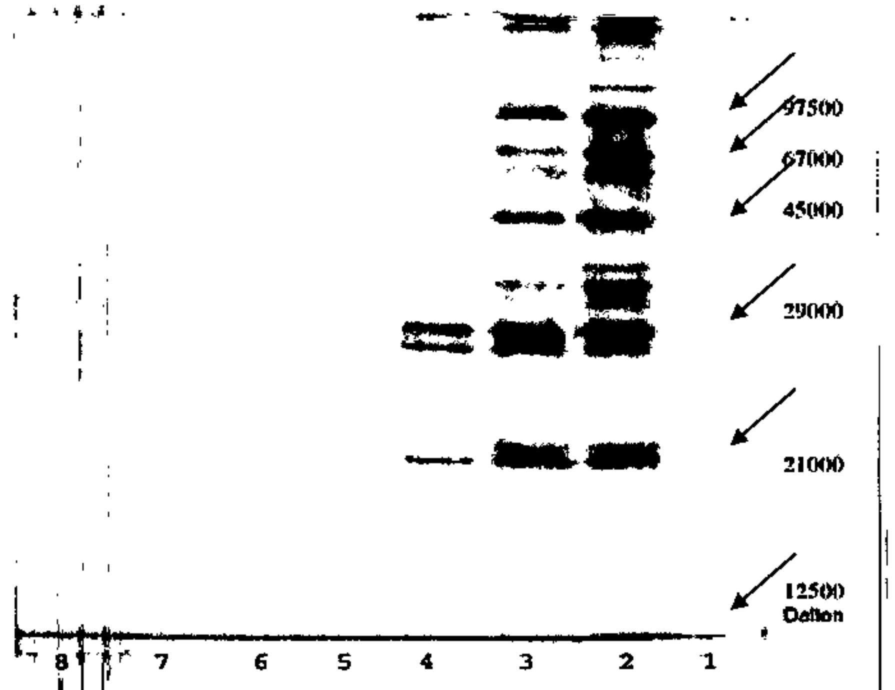
تشكلت أربع عصائب نتيجة لفصل بروتينات مستخلص الكيسات المذنبة دقيقة الرقبة في الشروط المخفضة في هلامة عديد الأكريلاميد، إذ كانت كتلها الجزيئيّة النسبية 67، 54، 27 و8 كيلودالتون (الشكل36)، فقد كانت هنالك ثلاث بروتينات مشتركة مع بروتينات السائل العُداري الكبدي وبروتينات السائل العُداري الرئوي (67، 54، 27 كيلودالتون). وتقاربت مع نتائج فصل بروتينات السائل العُداري الكبدي من الإصابة المفردة في عصابتين (27 ، 54).



الشكل36. فصل بروتينات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة في هلامة عديد الأكريلاميد 12%، صبغة أزرق كومازي R250: 1: واسم البروتين، 2، 4،3، 5، 6، 7: مكررات لبروتينات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة.

ث- فصل مستخلص بروتينات الشريطية التيسانيزية:

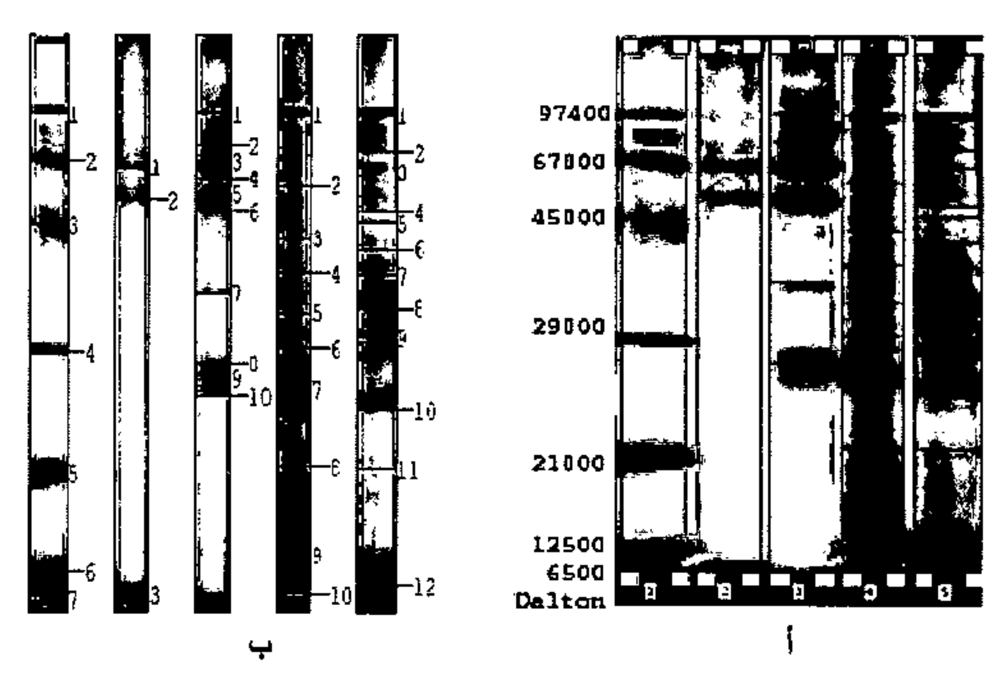
لقد تم فصل بروتينات الشريطية التيسانيزية في هلامة عديد الأكريلاميد تركيزها 12% (الشكل37)، وذلك بعد تنقيتها بالترسيب والديلزة ثم الاستفراد في عمود السيفادكس G-100، إذ تم الحصول على 21 عصابة تراوحت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 12 و250 كيلودالتون. وتقاربت مع السائل العُداري الكبدي في ثلاث عصائب (67، 38.35، 27.29 كيلودالتون)، ومع السائل العُداري الرئوي في أربع عصائب (67، 38.35، 27.29، 12 كيلودالتون).



الشكل37. فصل بروتينات الشريطية التيسانيزية في هلامة عديد الأكريلاميد 12%، صبغة أزرق كومازي R250. 1: واسم البروتين، الأعمدة من 2 إلى 8 تمثل توزع بروتينات الشريطية تيسانيزية المستفردة في هلامة السيفادكس.

ج- فصل مستخلص بروتينات الشريطية المونيزية اكسبانزا والمتورقة الكبديّة :

شكلت الشريطية المونيزية اكسبانزا نحو 13 عصابة كانت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 12 و 96 كيلودالتون بحيث تطابقت مع السائل العُداري الكبدي في عصابتين (67، 38 كيلودالتون)، وتقاربت مع السائل العُداري الرئوي في ثلاث عصائب (38، 22، 12، كيلودالتون) (الشكل 38). في حين شكلت المتورقة الكبديّة 10 عصائب تراوحت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 11 و 96 كيلودالتون (الجدولين 3 و4)، وقد تقاربت مع السائل العُداري الكبدي في ثلاث عصائب (57، 38، 27، كيلو دالتون)، في حين تقاربت مع السائل العُداري الرئوي في خمس عصائب (57، 38، 27، 22، 11) (الشكل38) (الجدول3).



الشكل38. فصل بروتينات الشريطية المونيزية اكسبانزا و المتورقة الكبديّة في هلامة عديد الأكريلاميد تركيز 12%، صبغة أزرق كومازي R250، الشكل (أ) 1: واسم بروتيني 2: بروتينات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة، 3: بروتينات السائل العداري الكبدي 4: بروتينات المتورقة الكبدية، 5: بروتينات المونيزية اكسبانزا. الشكل(ب) يبين تحليل العينة وتقدير الكتل الجزيئية بوساطة برنامج تحليل العصائب (UK) UVI ProPlatinum2 .

الجدول3. العصائب المشتركة بين بروتينات الديدان المدروسة المفصولة في هلامة عديد الأكريلاميد.

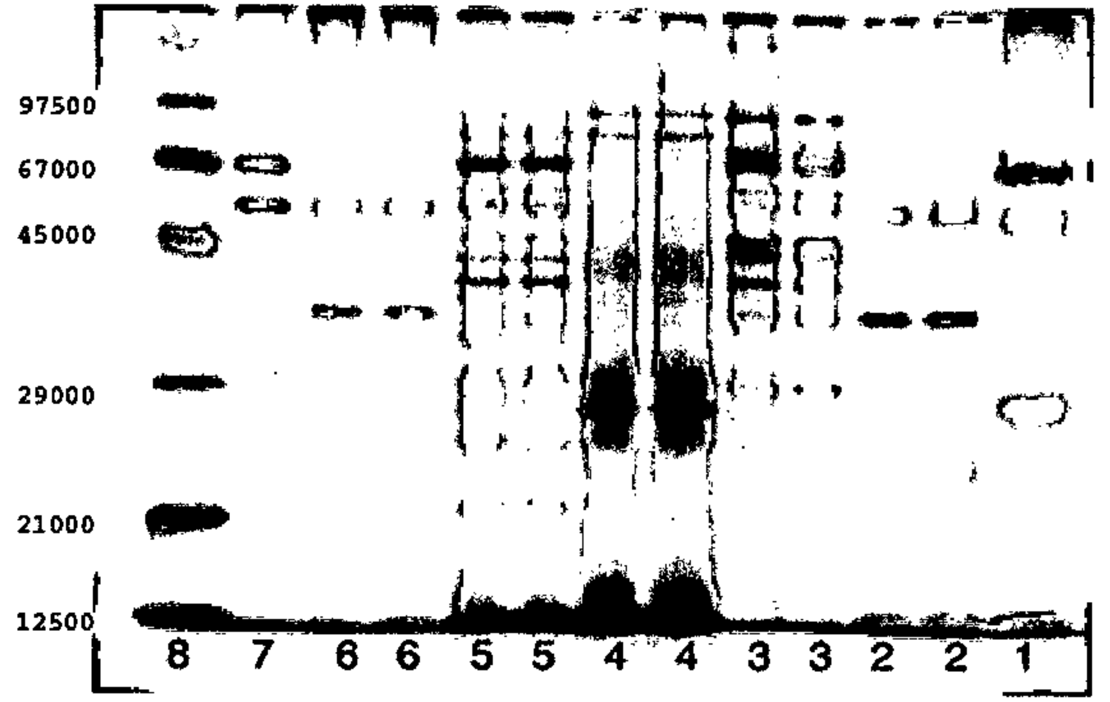
الشريطية تيسانيوية	المونيزية اكسبانزا	الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة	المتورقة الكبدية
67	67	67	–
42.65	42	–	43
38	38	–	38
34	34	–	33
27	–	27	27
25	25	–	–
12	12	–	12

الجدول4. العصائب غير المشتركة بين بروتينات الديدان المدروسة المفصولة في هلامة عديد الأكريلاميد.

الشريطية تيسانيزية	المونيزية اكسبانزا	الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة	المتورقة الكبدية
249.40	96	54	96
228.12	84	8	57
209.88	72		29
173.40	64		22
130.84	49		14
84.29	31		
59.20	22		
51.88			
45.00			
40.33			
32.86			
31.92			
28.82			
25.60			

ح- مقارنة بين فصل بروتينات الكيسات العُدَارِيّة المفردة والمزدوجة في الرحلان الكهربائي:

يبين الشكل39 والجدول5 نتيجة فصل بروتينات السائل العداري الرئوي المفرد حيث ظهرت خمس عصائب كتلها الجزيئيّة النسبية 54، 35.4، 27، 24، 21 كيلودالتون. فقد تطابقت مع نتيجة فصل السائل العُداري الرئوي المزدوج في عصابتين (54، 27 كيلودالتون) واختلفت معه في ثلاث عصائب (35.4، 24، 21 كيلودالتون) من أصل ست عصائب كانت قد شكلها السائل العداري الرئوي المزدوج أثناء فصلها(67، 54، 38، 27، 22، 12 كيلودالتون).



الشكل39. مقارنة بين فصل بروتينات الكيسة العُذاريّة المزدوجة والمفردة والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة في هلامة عديد الأكريلاميد تركيزها 12%، صبغة أزرق كومازي R250 ، 1: سائل كيسات عدارية رئوية من إصابة مزدوج، 2: سائل كيسات عدارية رئوية مفرد، 3: رؤيسات كيسات عدارية كبدية، 4: رؤيسات كيسات عدارية رئوية من إصابة مفردة، 5: رؤيسات كيسات عدارية رئوية إصابة مزدوجة، 6: سائل كيسات عدارية رئوية إصابة مفردة، 7: كيسة مذنبة دقيقة الرقبة، 8: واسم البروتين.

الجدول5 .العصابات المشتركة وغير المشتركة بين بروتينات السائل العداري الرئوي في الإصابتين المفردة والمزدوجة.

العصائب المشتركة		العصائب غير المشتركة	
الإصابة المزدوجة	الإصابة المفردة	الإصابة المزدوجة	الإصابة المفردة
54	54	67	36
27	27	38	24
22	21	12	-

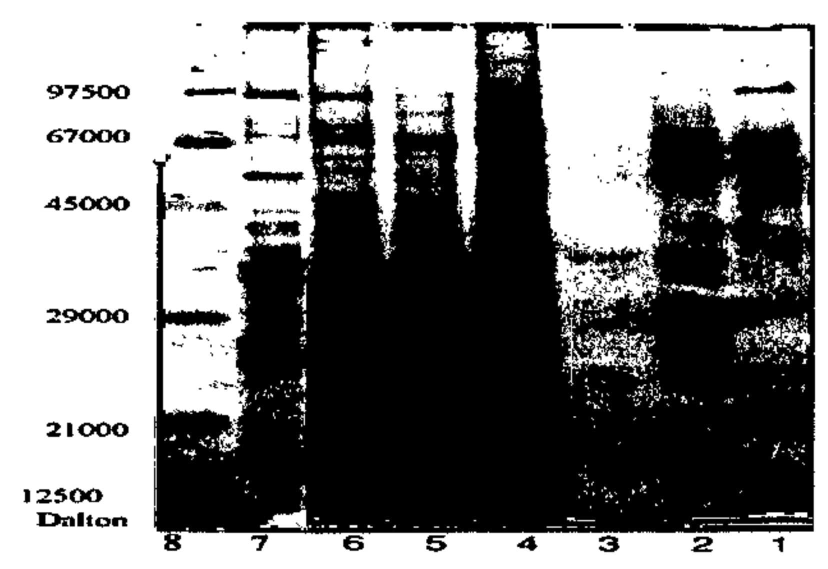
في حين تبين وجود 14 عصابة عند فصل بروتينات الرؤيسات العُذاريّة الرئوية المفردة، تراوحت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 17–91 كيلودالتون (الجدول6)، بينما تشكلت 13 عصابة عند

فصل بروتينات الرؤيسات العُدَاريّة الرئوية المزدوجة تراوحت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 21 و91 كيلودالتون (الشكلين39 و 40) (الجدول6). إذ تطابقت في عصابتين (91، 80 كيلودالتون)، وتقاربت في أربع عصائب (59 مقابل59.5، 42.6 مقابل 43، 40 مقابل40.2، 25.3 مقابل25.4 كيلودالتون)، عموماً كون تلك الكتل حسبت بشكل تقديري لذلك يمكن القول هناك تطابق بين عصائب الرؤيسات العدارية الرئوية في الإصابتين المفردة والمزدوجة في سبع عصائب، بينما كان هناك اختلاف في سبع عصائب.

الجدول6. العصابات المشتركة وغير المشتركة بين بروتينات رؤيسات الكيسات العدارية الرئوية في الإصابتين المفردة والمزدوجة.

العصائب المشتركة		العصائب غير المشتركة	
الإصابة المزدوجة	الإصابة المفردة	الإصابة المزدوجة	الإصابة المفردة
91	91	68	66.24
80	80	56	49.7
59	59.5	45	37.6
42.6	43	39.3	35
25.3	25.4	23.5	29.4
28	27.4	21.9	20.3
40	40.2	-	17.03

بينما تشكلت 17 عصابة لدى فصل بروتينات الرؤيسات العدارية الكبدية المزدوجة تراوحت كتلها الجزيئية النسبية بين 13 و125 كيلودالتون (الشكلين39 و40)، فقد كانت هناك ثماني عصائب شائعة بينها وبين بروتينات الرؤيسات العدارية الرئوية المزدوجة (90، 67، 58، 45، 39، 28.8، 23.4، 21.6 كيلودالتون) (الجدول7). أما عند المقارنة مع بروتينات السائل العداري الكبدي المفصول في هلامة عديد الأكريلاميد فقد تشاركت في العصائب ذات الكتل الجزيئية النسبية 67، 54، 27، 16 كيلودالتون، في حين تشاركت مع بروتينات السائل العداري الرئوي المزدوج في العصائب ذات الكتل الجزيئية النسبية 67، 54، 27، 22 و12 كيلودالتون).



الشكل40. فصل بروتينات الرؤيسات الأولية في هلامة عديد الأكريلاميد 12% ، صبغة كومازي،

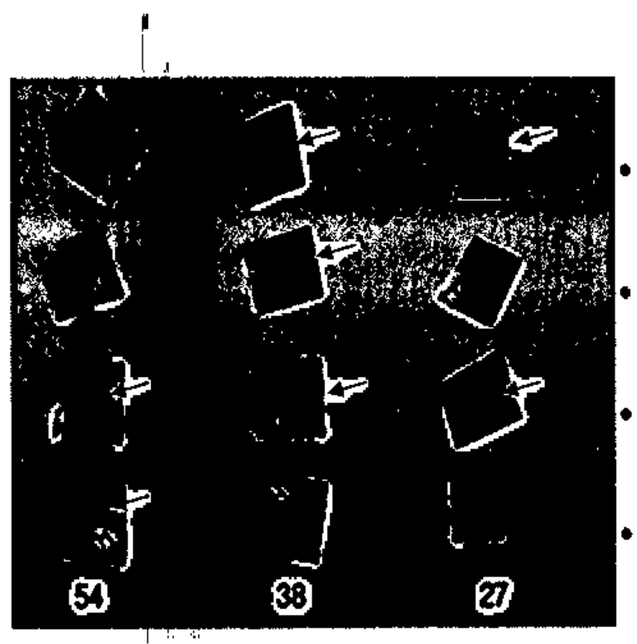
1 و 8 : واسمات بروتينية، 2: سائل عداري كبدي إصابة مزدوجة، 3: سائل عداري رئوي إصابة مزدوجة، 4: رؤيسات كيسات عدارية رئوية، 5: رؤيسات كيسات عدارية كبدية، 6: رؤيسات كيسات عدارية رئوية إصابة مفردة، 7: تيسانيزية قمة أولى.

الجدول7. العصابات المشتركة وغير المشتركة بين بروتينات الرؤيسات الأولية للكيسات العدارية الكبدية والرئوية في الإصابة المزدوجة.

العصائب المشتركة		العصائب غير المشتركة	
رؤيسات الكيسات العدارية الرئوية	رؤيسات الكيسات العدارية الكبدية	رؤيسات الكيسات العدارية الرئوية	رؤيسات الكيسات العدارية الكبدية
91	90	80	125
68	67	56	73
59	58	42.6	54.4
45	45	40	42.8
39.3	39	25.3	35.5
28	28.8	-	27
23.5	23.4	-	25
21.9	21.6	-	16
-	-	-	13

ثالثاً: التبصيم المناعي النقطي (Dot- Blot):

تفاعلت الأمصال وحيدة النوعية لتحت الوحدة 54 كيلو دالتون في التبصيم المناعي النقطي مع البروتينات الكلية للمونيزية اكسبانزا والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة، في حين لم تتفاعل مع المستضدات الكاملة للشريطية تيسانيزية والمتورقة الكبديّة.



- T: .*thysaniesa.*
- F: *Fasciola hepatica.*
- E: *Moniezia expansa.*
- H: C. *tenuicollis*

الشكل41. اختبار التبصيم المناعي النقطي (Dot-blot) ، تفاعل الأمصال وحيدة النوعية لوحدات السائل العداري الكبدي 27، 38، 54 كيلودالتون مع المستضدات الخام للديدان المدروسة، وفق الآتي: T : الشريطية تيسانيزية، F: الدودة المتورقة الكبدية ، E: الشريطية المونيزية اكسبانزا، H:الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة.

بينما تفاعلت الأمصال وحيدة النوعية لتحت الوحدة 38 كيلو دالتون مع المستضدات الكلية لكل من الشريطية تيسانيزية والمتورقة الكبديّة بشكل قوي. في حين تفاعلت بشكل ضعيف مع المونيزية اكسبانزا، بينما لم تتفاعل مع مستضدات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة.

كما أن الأمصال وحيدة النوعية لتحت الوحدة 27 كيلودالتون تفاعلت مع مستضدات الشريطية المونيزية اكسبانز والشريطية تيسانيزية ولم تتفاعل مع المستضدات الكاملة للكيسة المذنبة دقيقة الرقبة والمتورقة الكبديّة (الشكل41) (الجدول8).

الجدول8. نتائج التفاعلات التصالبيّة بين الأمصال وحيدة النوعية لوحدات السائل العُداري ومستضدات الديدان المدروسة.

المصل وحيد النوعية للمستضد / اسم الطفيلي	27 كيلودالتون	38 كيلودالتون	54 كيلودالتون
الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة	لايوجد	لايوجد	+++
المونيزية اكسبانزا	+++	+	+++
الشريطية تيسانيزية	+++	+++	لايوجد
المتورقة الكبديّة	لايوجد	+++	لايوجد

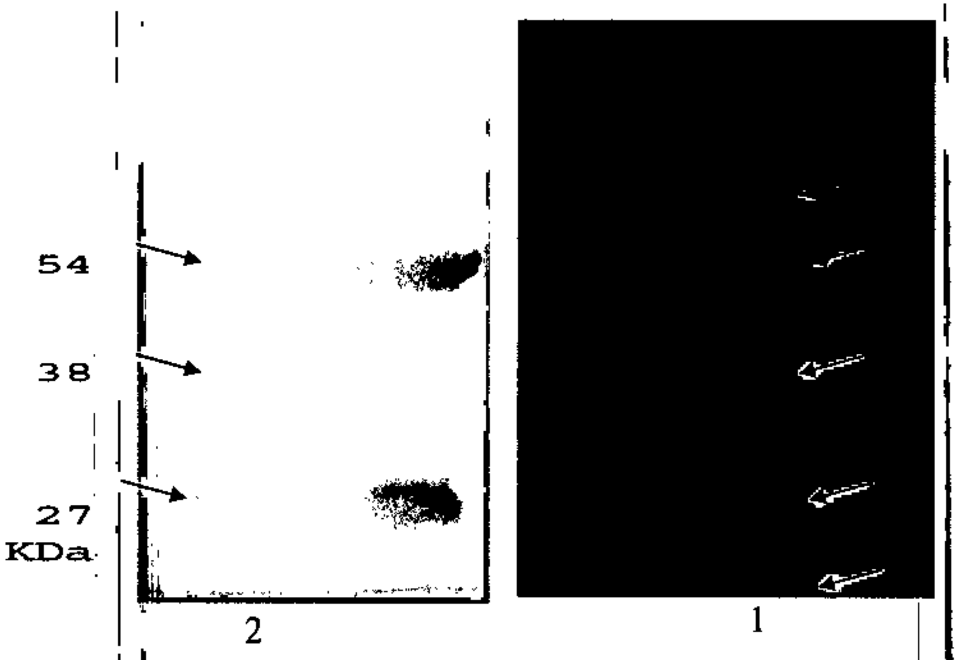
+ : تفاعل ضعيف.

+++: تفاعل قوي

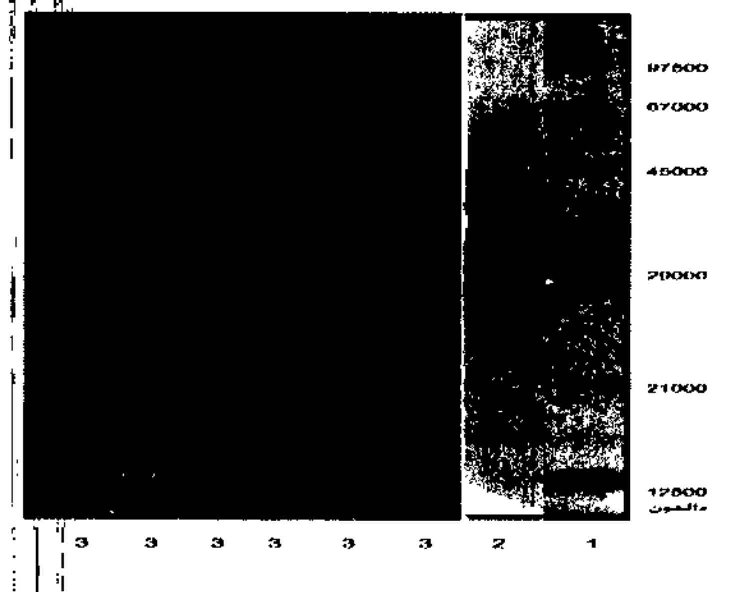
رابعاً: التبصيم المناعي (Western Blot):

1- التبصيم المناعي للكشف عن المستضدات في السائل العُداري الكبدي ذات الفاعلية المناعية:

أبدت العصائب ذات الكتل الجزيئيّة النسبية 54 و38 و27 كيلو دالتون الناتجة عن فصل بروتينات السائل العُداري الكبدي في هلامة عديد الأكريلاميد فاعلية مناعية مع أضداد الكيسات العُدَارِيّة النوعية في أمصال الأغنام الايجابية، في حين لم تبد العصائب ذات الكتل الجزيئيّة النسبية 67 و 16 كيلو دالتون أية فاعلية مناعية مع أضداد الكيسات العُدَارِيّة (الشكلين42 و 43).



الشكل42. التبصيم المناعي لمستضدات سائل الكيسات العُدَارِيّة الكبديّة مع أمصال ايجابية للكيسات العُدَارِيّة: 1- استفراد السائل العُداري الكبدي الكلي في هلامة عديد الأكريلاميد بتركيز 12%، وصبغة كومازي، 2-التبصيم المناعي وإظهار العصائب التي تفاعلت مع الشاهد الايجابي (أمصال الأغنام المصابة بالكيسات العدارية) على غشاء النتروسيللوز بقطر 0.45 أنغستروم واستعمال ركيزةTMB الخاصة بالأغشيّة.

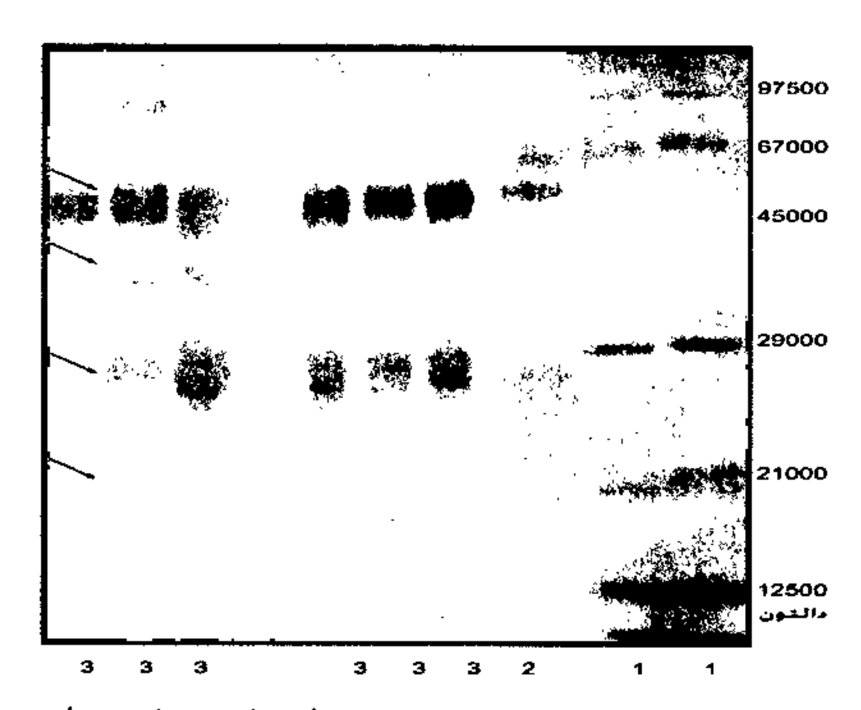


الشكل43. التبصيم المناعي لمستضدات السائل العُداري الكبدي

1: واسم البروتين على غشاء النتروسيللوز ملون بصبغة الأميدوبلاك، 2 :سائل عداري كبدي على غشاء النتروسيللوز ملون بصبغة الأميدوبلاك،3: عصائب السائل العداري الكبدي التي التي تفاعلت بوجود ركيزة TMB الخاصة بالأغشية.

2- التبصيم المناعي للكشف عن المستضدات في السائل العُداري الرئوي ذات الفاعلية المناعية:

لقد تفاعلت العصائب ذات الكتل 54 و38 و27 و 22 كيلودالتون مع الأضداد النوعية للكيسات العُدَارِيّة في أمصال الأغنام المصابة بداء الكيسات العدارية، في حين لم تبد العصابة ذات الكتل الجزيئيّة النسبية 67 كيلودالتون أية فاعلية مناعية (الشكل44).



الشكل44. التبصيم المناعي لمستضدات سائل الكيسات العُدارية الرئوية مع الأمصال الايجابية للكيسات العُدَارِيّة.

1: واسم البروتين على غشاء النتروسيللوز ملون بصبغة الأميدوبلاك، 2 :سائل عداري رئوي على غشاء النتروسيللوز ملون بصبغة الأميدوبلاك،3: عصائب السائل العداري الرئوي التي تفاعلت بوجود ركيزة TMB الخاصة بالأغشية.

3- التبصيم المناعي للكشف عن مستضدات الرؤيسات الأولية ذات الفاعلية المناعية:

ظهرت تسع عصائب تمثل مستضدات الرؤيسات الأولية للكيسات العدارية الكبديّة ذات الفاعلية المناعية مع أمصال الأغنام الايجابية المرجعية النوعية للكيسات العُدَارِيّة (59، 54، 39، 29، 27، 25، 22، 16، 13 كيلودالتون)، في حين تفاعلت ثماني عصائب تمثل مستضدات الرؤيسات الأولية للكيسات العدارية الرئوية مع أمصال الأغنام الايجابية المرجعية النوعية للكيسات العُدَارِيّة (59، 45، 43، 40، 39، 28، 25، 22)، وكان منها ثلاث عصائب ذات فاعلية مناعية قوية (40،59، 39، كيلودالتون) (الشكل45).

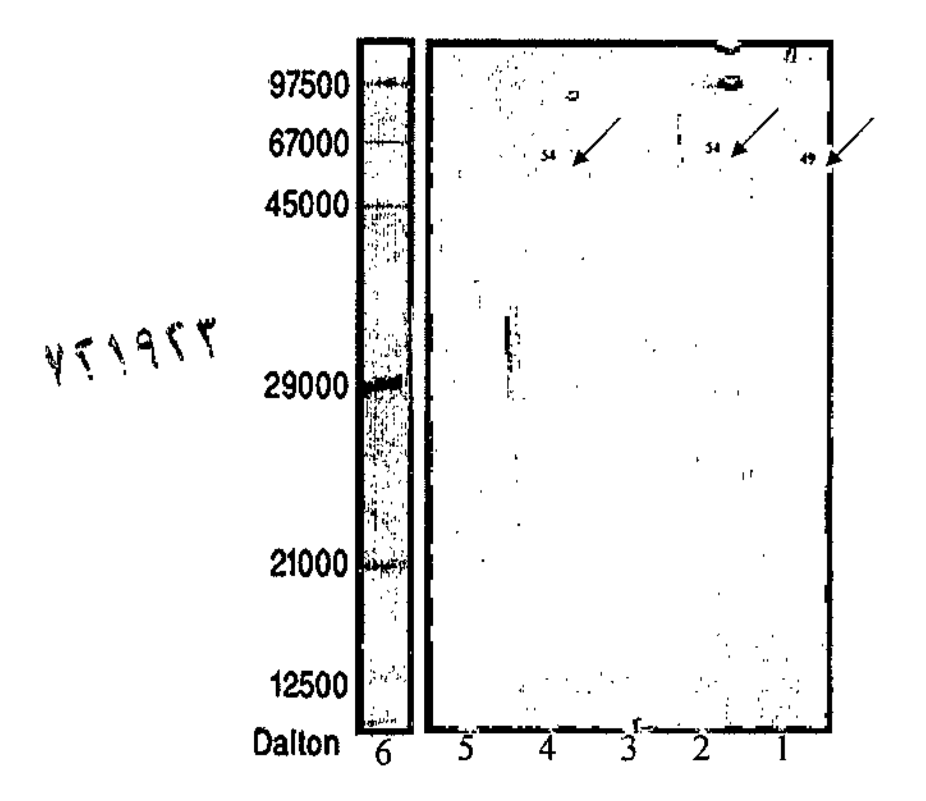


الشكل45. اختبار التبصيم المناعي لمستضدات الرؤيسات الأولية للكيسات العُدَاريّة مع الأمصال الايجابية. 1: واسم البروتين، 2 و3: مستضدات رؤيسات الكيسات العدارية الرئوية ، 4: مستضدات رؤيسات الكيسات العدارية الكبدية.

4- التبصيم المناعي للكشف عن العصائب ذات الفاعلية المناعية التصالبيّة مع مستضدات الديدان الأخرى المدروسة:

أ- تفاعل الأمصال وحيدة النوعية للعصابة 54 كيلودالتون مع مستضدات الديدان المدروسة:

لقد تفاعلت مستضدات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة (العصابة 54 كيلودالتون)، والشريطية المونيزية اكسبانزا أيضاً في العصابة 49 كيلودالتون، والسائل العداري في العصابة 54 كيلودالتون مع الأمصال وحيدة النوعية للأرانب الممنعة بالمستضد 54 كيلودالتون، بينما لم تتفاعل مستضدات التيسانيزية والمتورقة الكبدية مع تلك الأمصال العائدة للأرانب الممنعة بالمستضد54 كيلودالتون (الشكل46).

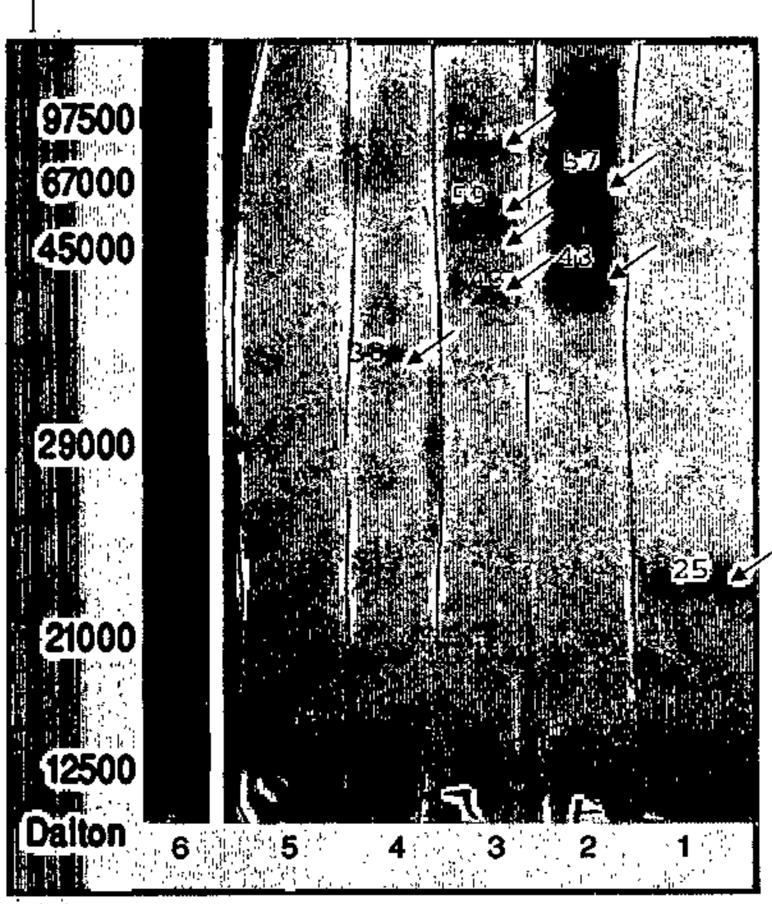


الشكل46. تفاعل الأمصال وحيدة النوعية للعصابة54 كيلودالتون مع مستضدات الديدان الأخرى.

1: الشريطية المونيزية اكسبانزا، 2: السائل العُداري الكبدي، 3: الدودة المتورقة الكبدية ، 4: الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة 5: الشريطية تيسانيزية، 6: واسم البروتين.

ب-تفاعل الأمصال وحيدة النوعية للمستضد 38 كيلودالتون مع مستضدات الديدان المدروسة:

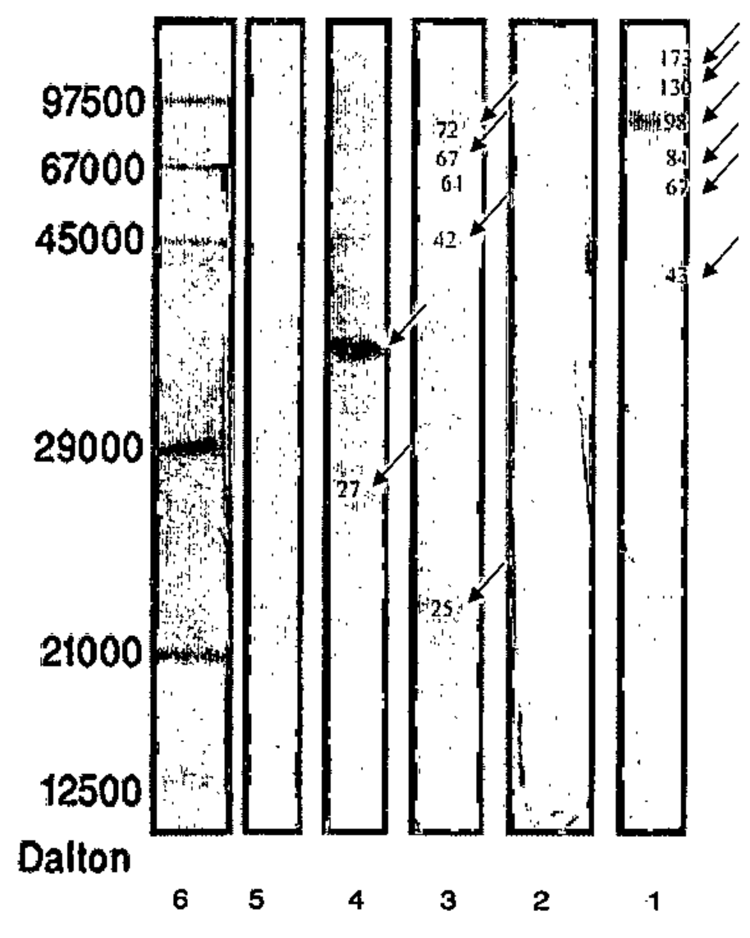
تفاعلت الأمصال وحيدة النوعية العائدة للأرانب الممنعة بالمستضد 38 كيلو دالتون مع مستضدات الشريطية المونيزية اكسبانزا (العصابة25 كيلودالتون) والدودة المتورقة الكبدية (العصابتين ذات الكتل الجزيئية النسبية 57 و 43 كيلودالتون) والسائل العداري الكبدي (العصابة 38 كيلودالون)، كما تفاعلت مع الشريطية التيسانيزية (العصائب ذات الكتل الجزيئية 84، 59، 45، 43 كيلودالتون)، في حين لم تبد أي تفاعل مع مستضدات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة، (الشكل47).



الشكل47. تفاعل الأمصال وحيدة النوعية للعصابة 38 كيلودالتون مــع مستضــدات الديــدان المدروسة. 1: المونيزية اكسبانزا، 2: الدودة المتورقة الكبدية ، 3: الشريطية تيسانيزية، 4: السائل العُداري الكبدي، 5: مستضدات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة، 6: واسم بروتيني.

ت- تفاعل الأمصال وحيدة النوعية للمستضد 27 كيلودالتون مع مستضدات الديدان المدروسة:

تفاعلت الأمصال وحيدة النوعية العائدة للأرانب الممنعة بالمستضد 27 كيلــو دالتــون مــع مستضدات الشريطية تيسانيزية فظهرت ثلاث مستضدات توافق الكتل الجزيئية النســبية 43، 67، 84، 98، 130، 173 كيلودالتون، وكذلك تفاعلت تلك الأمصال مع الشريطية المونيزية اكسبانزا فظهرت عدة مستضدات (25 ، 42، 64، 67، 72، كيلودالتــون)، ومــع الســائل العداري الكبدي (العصابتين38 و 27 كيلودالتون)، في حين لم تتفاعل مستضــدات الــدودة المتورقة الكبدية والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة مع تلك الأمصال (الشكل48).



الشكل48. تفاعل مع الأمصال وحيدة النوعية للعصابة 27 مع مستضدات الديدان المدروسة.

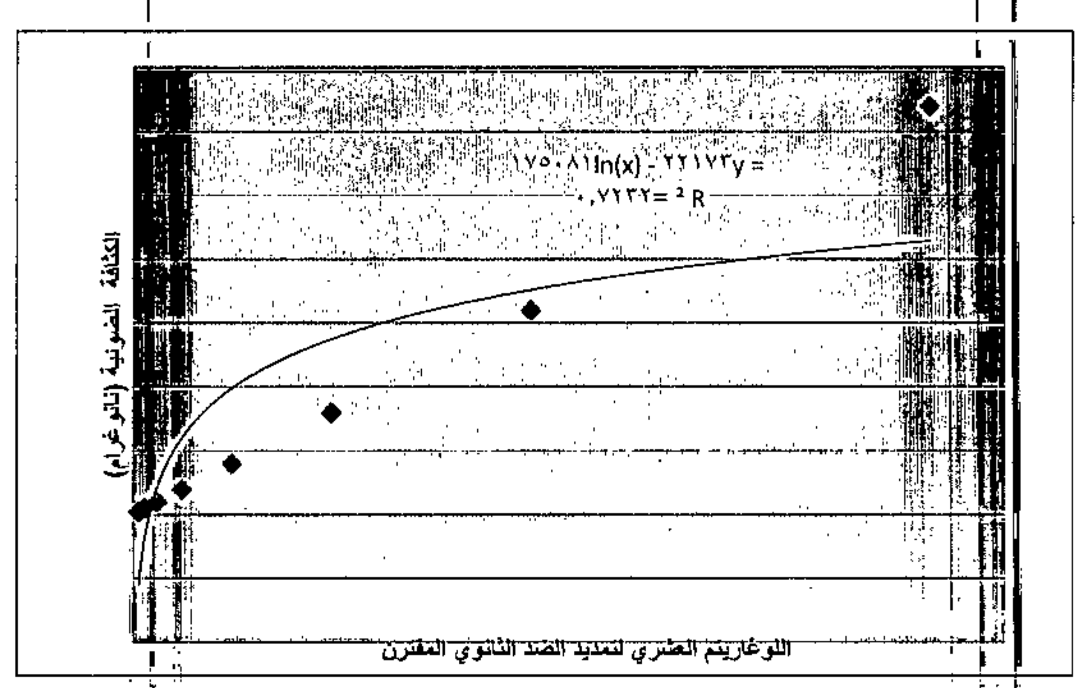
1: الشريطية تيسانيزية 2: الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة، 3: الشريطية المونيزية اكسبانزا، 4: السائل العُداري الكبدي، 5: الدودة المتورقة الكبدية ، 6: واسم البروتين.

ويلاحظ هناك تماثل في نتائج التبصيم المناعي مع نتائج التبصيم المناعي النقطي الذي طبق على المستضدات الكلية تمت تنقيتها في عمود الكروماتوغرافيا فقط، في حين اعتمد في التبصيم المناعي على مستضدات نقية مفصولة في هلامة عديد الأكريلاميد.

خامساً: المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة(Indirect- Elisa):

أ- تحديد التمديد المثالي لكل من المصل والأضداد الثانوية:

ولتحديد التمديد المثالي(Optimal dilution) لكل من المصل والضد الثانوي المقترن بالإنظيم. تم تطبيق طريقة تمديدات رقعة الشطرنج (Checkerboard) والتي مثلت البيانات من خلال رسم المخطط البياني اللوغاريتم العشري ومعرفة مستوى ومنطقة الانحدار Plateau على اتجاه المنحى البياني (Tender) (الشكل49).



الشكل49. مخطط بياني لوغاريتمي لتحديد التمديدات المثالية لكل من المصل، والضد الثانوي المقترن بالإنظيم (Checkerboard).

ب- تحديد التركيز المثالي للمستضد والتمديد المثالي للأضداد الثانوية المقترنة بالإنظيم.

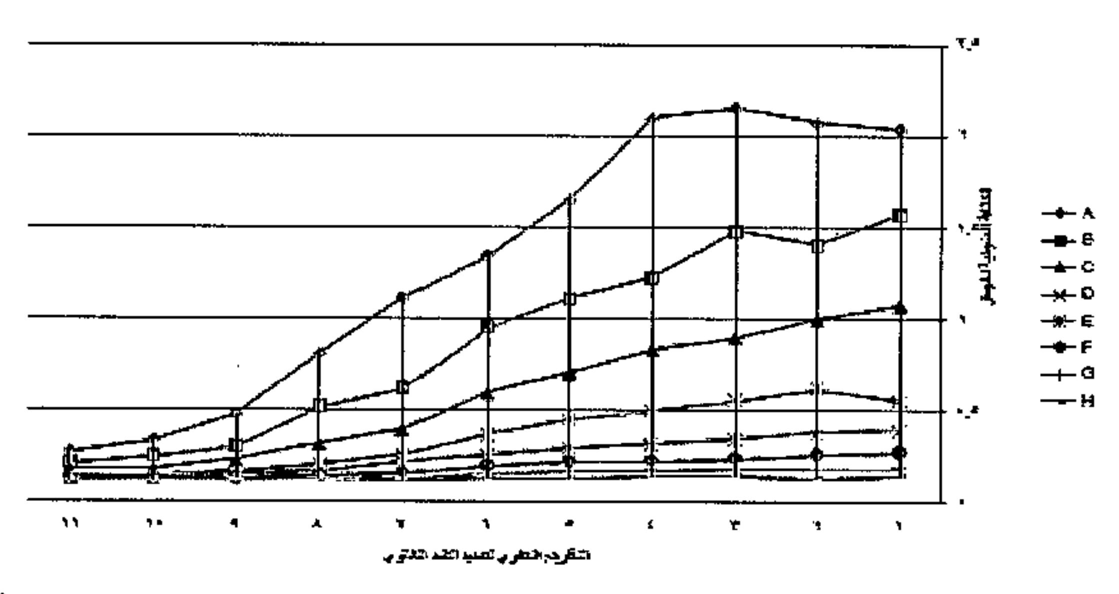
بينت النتائج أن أفضل تركيز لمستضدات السائل العُداري الكبدي المنقى جزئياً كان 1.2 مكغ/مل بحيث انخفضت التفاعلات غير النوعية، وتشكلت خلفية صافية تقريباً في حفر طبق الإليزا الممتزة بالمستضد وهذه نتيجة سلسلة من التجارب التي استخدمت العديد من التمديدات.

كما يتضح من الشكل49 أن أفضل تمديدات المصل تراوحت مابين 1:400 و1:800، حيث كان عندها R= 0.723 وهو ارتباط قوي، في حين تراوحت أفضل تمديدات الضد الثانوي المقترن بالإنظيم بين 1:4000 و 1:8000. وعند إجراء سلسلة من التجارب وجد أن التمديد 1:8000 هو الأفضل الذي استعمل عند إجراء اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم للكشف عن أضداد الكيسات العدارية في أمصال الأغنام.

الجدول9. قراءات الكثافة الضوئية بتقنية الاليزا غير المباشرة بطريقة رقعة الشطرنج لتحديد التركيز المثالي للمستضد.

	تركيز المستضد مكغ/مل / تمديد الضد الثانوي	0.25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.781	0.390	0.195	0.097	0.049	0.025
A	1:2000	2.04	2.07	2.152	2.096	1.65	1.35	1.119	0.811	0.478	0.339	0.277
B	1:4000	1.579	1.409	1.485	1.229	1.114	0.958	0.622	0.521	0.299	0.253	0.209
C	1:8000	1.077	1.001	0.902	0.836	0.706	0.596	0.395	0.319	0.224	0.183	0.179
D	1:16000	0.553	0.623	0.559	0.501	0.451	0.373	0.262	0.209	0.175	0.144	0.143
E	1:32000	0.398	0.379	0.346	0.325	0.301	0.261	0.219	0.172	0.151	0.13	0.131
F	1:64000	0.277	0.26	0.243	0.231	0.226	0.197	0.157	0.145	0.135	0.127	0.12
G	1:128000	0.188	0.183	0.186	0.175	0.174	0.157	0.134	0.136	0.129	0.125	0.125
H	1:256000	0.145	0.138	0.147	0.142	0.138	0.133	0.125	0.128	0.135	0.127	0.121

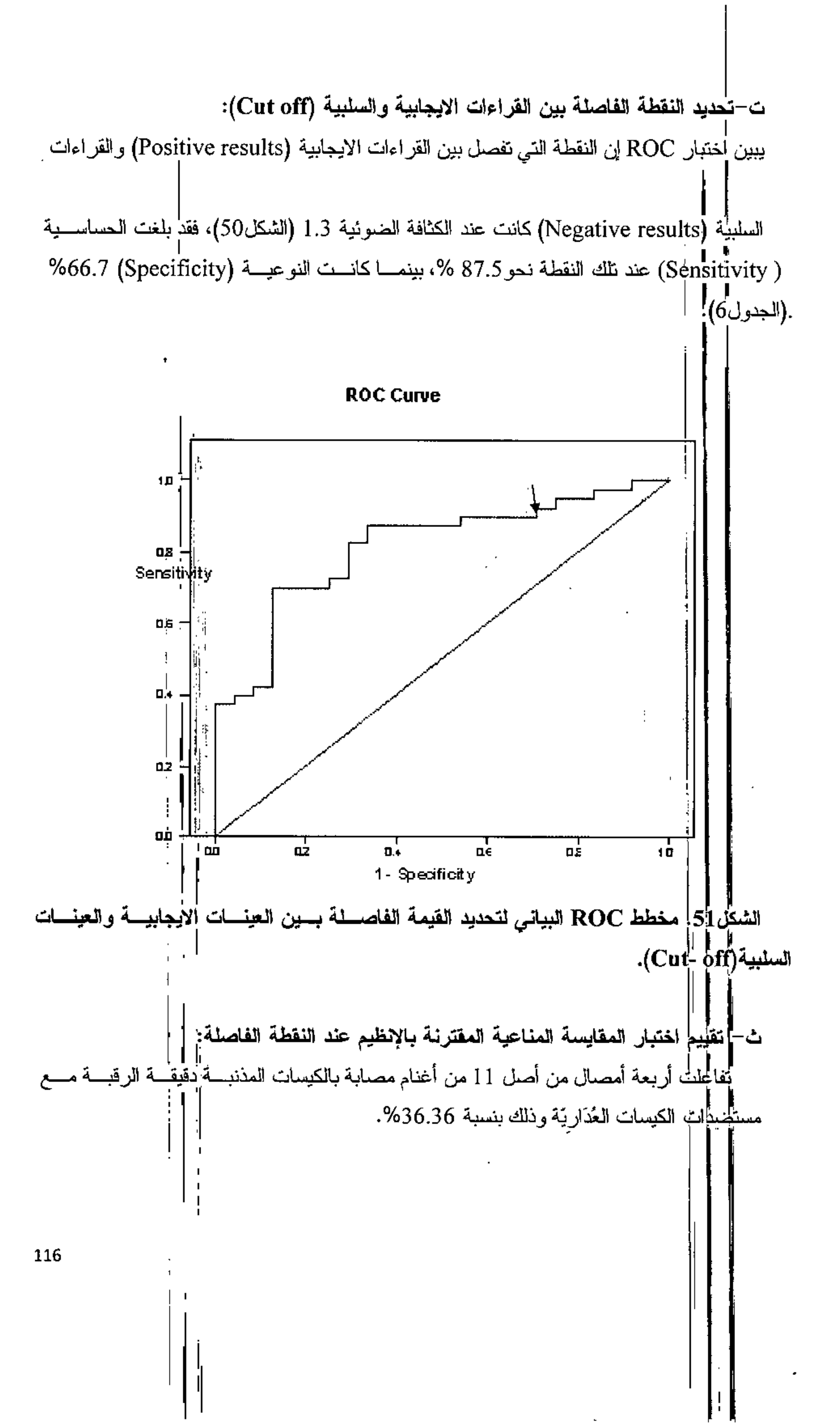
وقد مثلت هذه القرات بيانياً وفق الشكل50.



الشكل50. مخطط بياني لتحيد التركيز المثالي للمستضد والتمديد المثالي للضد الثانوي بطريقة رقعة الشطرنج.

ت–تحديد النقطة الفاصلة بين القراءات الايجابية والسلبية (Cut off):

يبين اختبار ROC إن النقطة التي تفصل بين القراءات الايجابية (Positive results) والقراءات السلبية (Negative results) كانت عند الكثافة الضوئية 1.3 (الشكل50)، فقد بلغت الحساسية (Sensitivity) عند تلك النقطة نحو87.5 %، بينما كانت النوعية (Specificity) 66.7% (الجدول6).



الشكل51. مخطط ROC البياني لتحديد القيمة الفاصلة بين العينات الايجابية والعينات السلبية(Cut- off).

ث– تقييم اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم عند النقطة الفاصلة:

تفاعلت أربعة أمصال من أصل 11 من أغنام مصابة بالكيسات المذنبة دقيقة الرقبة مع مستضدات الكيسات العُدَارِيّة وذلك بنسبة 36.36%.

الجدول10. تحديد الحساسية والنوعية لاختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة.

العينات الايجابية			العينات السلبية			المؤشرات الإحصائية			
بالعين المجردة	الحقيقية	الكاذبة	بالعين المجردة	الحقيقة	الكاذبة	الحساسية(%)	النوعية(%)	PPV(%)	NPV(%)
40	35	8	24	16	5	87.5	66.66	81.4	76.2

من الجدول10 تم حساب قيمتي التنبؤ الايجابية والسلبيةلاختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم، حيث بلغت نسبة التنبؤ الايجابي (PPV) نحو 81.4%، بينما كانت نسبة التنبؤ السلبي(NPV) نحو 76.2% وهذا يعني أن الاختبار قادر على أن يكشف الحالات الايجابية الحقيقية بنسبة 81.4% ، و بنسبة 76.2% من الحالات السلبية الحقيقة في الاختبار الكاشف.

5- المناقشة

(Discussion)

يعد داء الكيسات العُدَاريّة مرضاً واسع الانتشار في العالم، وواسع الانتشار في الحيوان لاسيما في الأغنام والإنسان، ويسبب خسائر اقتصادية هامة، وهي من أكثر الأمراض المشتركة الطفيلية انتشاراً في الإنسان (MacManus وزملاؤه، 2003)، وقد صنف المشوكة الحبيبية إلى تسع ذراري وفقاً للواسمات الجينية (Meslin و Pawlowski، 2002). ونظراً لعدم وجود برنامج سيطرة على المرض في سورية فقد لوحظت زيادة واضحة في نسبة انتشار الكيسات العُدَاريّة في السنوات الأخيرة حيث بلغت نحو 49.20% (الياسين وكروالي، 2011)، ولذلك من الجدير الاهتمام بهذا المرض وإعداد البرامج اللازمة لتشخيصه من أجل الحد من انتشاره، إذ يساعد التشخيص المبكر في نجاح المعالجة الكيماوية. ولذلك فقد طورت العديد من وسائل التشخيص المصلي للكيسات العُدَاريّة لاسيّما عند الإنسان باستعمال مستضدات من مصادر حيوانية، إلا أن الكفاءة التشخيصية لتلك المستضدات مازالت ضعيفة في الحيوانات بسبب ارتفاع التفاعلات الايجابية الكاذبة (Kittelberger وزملاؤه، 2002)، كما أن لتشخيص الإصابة أهمية كبيرة عند الإنسان والحيوان غير أن تلك الاختبارات لم تكن نافعة بسبب التفاعلات التصالبيّة مع الديدان الأخرى. ولهذا فمن المهم تنقية مستضدات الكيسات العُدَاريّة ودراسة بعض التفاعلات التصالبيّة وتشخيص الإصابة بوساطة اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم والتبصيم المناعي. لذلك كان من المهم تقييم مستضدات السائل العُداري المستفردة جزئياً بوجود أمصال أغنام محلية.

أوضحت نتائج استفراد البروتينات في عمود السيفادكس G-100 بسرعة 3مل/أنبوب/10دقيقة ظهور قمتين في استفراد السائل العُداري الكبدي (الشكل27)، وكذلك قمتين في استفراد السائل العُداري الرئوي (الشكل28) وذلك بعد عمليات النبذ والترسيب والديلزة وكانت القمة الأولى هي الأعلى، وهذه النتائج تطابقت مع نتائج التي حصل عليها الياسين (2006) باستفراد السائل العُداري الغنمي الكبدي والرئوي نتيجة الاستفراد في عمود السيفادكسG-50 وبذلك لم يكن هناك خلاف بين الاستفراد بالسيفادكس G-50 والاستفراد بالسيفادكس G-100، كما تطابقت مع نتائج رمضان(1992) التي استعملت السائل العُداري الرئوي البشري حيث حصلت على قمتين أيضاً في السيفادكس G-50، وكذلك مع Hamel و Ris(1982) اللذان حصلا على قمتين، ومع Nandi وRamajeyam(1990) اللذان استفردا السائل العُداري الغنمي بالاستشراب السائلي باستعمال عمود السيفادكس G-200 ثم إمرارها في عمود يحتوي هلامة السيللوز DEAE. إلا أنها اختلفت مع النتائج التي حصل عليها

Quilici وزملاؤه (1971)، إذ حصلوا على أربع قمم من جراء استفراد بروتينات السائل العُداري الكبدي الغنمي باستعمال هلامة السيفادكس G-25 ثم إمرارها في عمود السيللوز DEAE، كما اختلفت مع نتائج التي حصل عليها Bout وزملاؤه (1974) إذ حصلوا أيضاً على أربع قمم في السيفادكس G-200، ويمكن أن تعزى تلك الاختلافات إلى اختلاف تقنيات الكروماتوغرافيا المستعملة حيث تتم على مرحلة واحدة فقط أو أكثر، كما يمكن أن تعزى إلى التقنيات المستعملة وطرائق العمل والمواد المستخدمة في استفراد البروتينات وتحضير العينات قبل إمرارها في عمود هلامة السيفادكس، أو إلى المنطقة الجغرافية وقد يكون لاختلاف الذرية دوراً في ذلك.

وعند استفراد بروتينات العينة العُداريّة الرئوية الكاملة (السائل والرؤيسات) في الإصابة المفردة في الشروط السابقة نفسها (الشكل29) تشكلت ثلاث قمم واضحة ومتقاربة في الارتفاع حيث توافقت مع نتائج الياسين (2006) لدى استفراده عينة الكيسات العُداريّة الرئوية الكاملة في الإصابة المزدوجة، وهذا يعني أنه قد لايوجد اختلاف بين استفراد العينة الرئوية الكاملة في الإصابة المفردة والمزدوجة في عمود السيفادكس.

أما في استفراد بروتينات عينات الديدان المدروسة للتفاعلات التصالبيّة وفي الشروط السابقة نفسها فقد تشكلت قمتين للشريطية المونيزية اكسبانزا (الشكل30)، كما تشكلت قمتين في الشريطية تيسانيزية (الشكل31)، بينما تشكلت قمتين في استفراد بروتينات الدودة المتورقة الكبديّة وبروتينات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة الكاملة (الأشكال32 و33)، حيث تشابهت بذلك مع استفراد بروتينات السائل العُداري الكبدي والرئوي. في حين حصل Kandil وزملاؤه (2004) على ثلاث قمم عند استفراد بروتينات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة، ويمكن أن تعزى تلك الاختلافات مع الدراسة الحالية إلى طريقة العمل المستخدمة في تحضير العينة باستعمال الترسيب والتثفيل والديلزة قبل الاستفراد، إذ يمكن بذلك التخلص من بعض البروتينات منخفضة الكتلة الجزيئية التي بقيت العينات التي استعملت في دراسة Kandil وزملاؤه (2004) الذين استعملوا البروتين الخام مباشرة بدون عمليات الترسيب والتثفيل والديلزة في الاستفراد على هلامة السيفادكس، في حين تماثلت مع نتائج Sarma وزملاؤه (2002) حيث حصلوا على قمتين في استفراد المستضد الخام للكيسة المذنبة دقيقة الرقبة.

أما فيما يخص فصل العينات البروتينية المستفردة باستعمال الرحلان الكهربائي، فقد أوضحت النتائج بأنه تم الحصول على خمس عصائب من خلال فصل السائل العُداري الكبدي في هلامة عديد الأكريلاميد، وذلك في الشروط المخفضة، وكانت كتلها الجزيئيّة النسبية 67، 54، 38، 27، 16

كيلودالتون (الشكل34)، التي تماثلت مع نتائج الياسين (2006) من حيث عدد المستضدات (85.114، 67، 53.703، 26.915، 15.849 كيلودالتون)، غير أنها اختلفت فقط في العصابة 38 كيلو دالتون التي ظهرت في الدراسة الحالية، بدلاً من العصابة 85 كيلودالتون التي ظهرت في الدراسة السابقة وغابت في الدراسة الحالية، وقد يعود ذلك الاختلاف إلى أن العينة في الدراسة السابقة من ذرية مختلفة عن ذرية العينة في الدراسة الحالية، وعلى النتيجة نفسها كانت في دراسة رمضان(1992) حيث اختلفت بعض العصائب عندما فصلت بروتينات السائل العُداري الرئوي لعينتين بشرية عزلت من منطقتين جغرافيتين مختلفتين. وكذلك اختلفت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج Amelio وزملاؤه (1985)، الذين حصلوا على أربع عصائب (13، 29، 52، 67 كيلودالتون) بتطبيق تقنيّة الرحلان الكهربائي على سائل الكيسة العُدَارِيّة الكبديّة البشريّة مع الملاحظة بأن الكتل الجزيئيّة النسبية للعصائب متقاربة، واختلفت أيضاً مع نتائج Burgu وزملاؤه(2000) الذين حصلوا على تسع عصائب بروتينية نوعية للسائل العُداري الكبدي الغنمي باستعمال التقنية نفسها(200، 116، 98، 68، 58، 38، 24، 16، 8 كيلو دالتون)، وقد تطابقت مع نتائج الدراسة الحالية في ثلاث عصائب (68، 38، 16 كيلو دالتون)، واختلفت أيضاً مع Derbala (1998) الذي حصل على سبع عصائب بتحليل السائل العُداري للكيسات العُدَارِيّة عند الإبل، وكانت كتلها الجزيئيّة النسبية 28.8، 34.7، 38، 46.800، 72.4، 81.3، 100 كيلودالتون، وعلى ثلاث عصائب لدى تحليل سائل الكيسات العُدَارِيّة عند الحمير، إذ قدّرت كتلها الجزيئيّة النسبية بنحو 44.600، 128.300، 143.200 كيلودالتون. وقد يعود هذا الاختلاف إلى اختلاف الثوي واختلاف الذرية التي تصيب الحمير عن تلك التي تصيب الإبل وعن التي تصيب الأغنام (Meslin و Pawlowski، 2002).

أما بروتينات السائل العُداري الرئوي فقد انفصل إلى ست عصائب (الشكل35) كانت كتلها الجزيئيّة النسبية 67، 54، 38، 27، 22، 12 كيلو دالتون، وقد اختلفت عن نتائج رمضان (1992) التي حصلت على خمس عصائب (13.182، 29.512، 45.708، 57.543، 67.608 كيلودالتون) لدى فصلها بروتينات الكيسة العدارية الرئوية المعزولة من الإنسان، وأيضاً اختلفت مع نتائجها عند استعمالها عينة رئوية بشرية أخرى من منطقة جغرافية مختلفة عن المنطقة الأولى (19.952، 39.810، 47.863، 58.884، 67 كيلودالتون)، وكذلك اختلفت مع نتائج الياسين (2006) لدى عزله المستضدات من السائل العُداري الرئوي الغنمي (67، 53.703، 38، 29.615، 13 كيلودالتون) من حيث عدد العصائب، فقد حصلوا على خمس عصائب، غير أنها تماثلت من حيث الكتل الجزيئيّة النسبية للعصائب المفصولة، إذ سجلت في الدارسة الحالية العصابة 22 كيلو دالتون وغيابها في نتائج الدراسة السابقة.

وقد لوحظ أيضاً أن هنالك تقارب في الكتل الجزيئيّة النسبية للعصائب المعزولة من السائل العُداري الكبدي والرئوي، حيث تطابقت في أربع عصائب. ويمكن أن تعزى النتائج إلى أن كيسات الرئة وكيسات الكبد يمكن أن تكون من نفس الذرية في الإصابات المزدوجة، وأن الاختلافات في بعض العصائب يمكن أن تكون مشتقة من بروتينات الثوي أو العضو الذي تتوضع فيه الكيسة وعلاقة ذلك مع بروتينات الكبد أو الرئتين. كما أن لاختلاف نوع الثوي، واختلاف ذرية المشوكة الحبيبية، واختلاف الطرائق المستعملة في فصل البروتينات المستضدية التي قد تشكل دوراً كبيراً في اختلاف العصائب المستفردة (Taherkhani، 2001). ومن المعروف أن المستضد AgB الموجود في السائل العُداري ينفصل في الشروط المخفضة إلى الجزيئات 12، 16، 23 كيلودالتون (Zhang وMcManus، 2003)، وكذلك المستضد Ag5 الذي ينفصل إلى ثلاث جزيئات(56 و 67، 38 كيلودالتون) في الشروط المخفضة نفسها (Zhang وMcManus، 1996)، وهي بذلك تتشابه أو تتطابق مع الجزيئات التي فصلت من السائل العُداري الكبدي والرئوي في الدراسة الحالية. لكنها اختلفت مع نتائج kanwar وزملاؤه(1992) من حيث عدد العصائب، إذ فصلوا 15 عصابة من بروتينات السائل العُداري الغنمي بلغت كتلها الجزيئيّة النسبية 8-116 كيلودالتون، وقد يرجع ذلك إلى اختلاف الذرية التي تصيب الحيوان التي أخذت منه العينة. كما اختلفت عن نتائج Sabry (2007) إذ انفصل السائل العُداري الرئوي الذي جمع من الابل إلى 12 بروتين (105، 79، 62، 49، 38، 28، 24، 21، 18، 8 كيلو دالتون وعصابتين فوق 105 كيلودالتون) إذ كانت أربع عصائب منها تتقارب مع عصائب الدراسة الحالية (21، 28، 38، 62 كيلودالتون)، وقد يفسر هذا الاختلاف أيضاً إلى اختلاف الذرية فالذرية التي تصيب الإبل تختلف عن الذرية التي تصب الأغنام.

لقد فصلت بروتينات الشريطية التيسانيزية في هلامة عديد الأكريلاميد تركيزها 12% (الشكل37)، وذلك بعد تنقيتها بالترسيب والديلزة ثم الاستفراد في عمود هلامة السيفادكس G-100، إذ حصل على 21 عصابة تراوحت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 12 و250 كيلودالتون. وتبين وجود عدد من العصائب المشتركة مع السائل العُداري الكبدي (67، 38.35، 27.29 كيلودالتون)، ومع السائل العُداري الرئوي في الدراسة الحالية (67، 38.35، 27.29، 12 كيلودالتون). أما العينات العائدة إلى الشريطية المونيزية اكسبانزا فقد أظهرت 13 عصابة (الشكل38) تراوحت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 12 و 96 كيلودالتون، وقد تطابقت مع السائل العُداري الكبدي في عصابتين (67، 38 كيلو دالتون)، في حين تقاربت مع السائل العُداري الرئوي في ثلاث عصائب (38، 22، 12 كيلودالتون). ويمكن أن يعود هذا التقارب في بعض العصائب إلى كونها من العائلة أو الفصيلة نفسها،

كما يمكن أن يكون لتلك العصائب المتماثلة دوراً هاماً في التفاعلات المناعية التصالبيّة بين تلك الديدان وبروتينات الكيسة العُدَاريّة والتي تسبب ضعفاً في القوة التشخيصية المناعية في المختبر.

في حين أظهرت المتورقة الكبديّة 10عصائب (الشكل38)، تراوحت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 11 و 96 كيلودالتون (الجدول3) وقد تطابقت مع السائل العُداري الكبدي في ثلاث عصائب (57، 38، 27 كيلودالتون)، في حين تقاربت مع السائل العُداري الرئوي في خمس عصائب (57، 38، 27، 22، 11 كيلودالتون) وأيضا قد يسبب هذا التقارب والتطابق تفاعلات ايجابية كاذبة تضلل الاختبار وتخفض من نوعيته.

كما تشكلت أربع عصائب نتيجة لفصل بروتينات مستخلص الكيسات المذنبة دقيقة الرقبة في الشروط المخفضة في هلامة عديد الأكريلاميد، وكانت كتلها الجزيئيّة النسبية 67، 54، 27، 8 كيلودالتون (الشكل36)، إذ تطابقت مع نتائج فصل بروتينات السائل العُداري الكبدي وبروتينات السائل العُداري الرئوي في في ثلاث عصائب (67، 54، 27 كيلودالتون). تطابقت أيضاً مع نتائج فصل بروتينات السائل العُداري الكبدي المفرد في عصابتين (27 و54 كيلودالتون)، فقد يكون لتلك المستضدات أيضاً دوراً في التفاعلات التصالبيّة التي تشكلها الكيسات المذنبة دقيقة الرقبة بشكل كبير مع الكيسات العُدَاريّة. على النقيض من ذلك، فقد حصل Kandil وزملاؤه (2004) على نتائج مختلفة، إذ حصلوا على عصابتين كانت كتلها الجزيئيّة النسبية 103 و45 كيلودالتون وكانت العصابة الثانية أكثر وضوحاً بينما كانت الأولى ذات تركيز منخفض وذلك باستعمال المستضد الخام للكيسة المذنبة دقيقة الرقبة وأيضاً للكيسة المذنبة الغنمية والبقرية، ربما توجد ذراري مختلفة من الشريطية هيداتيجينا كما هو الحال في الكيسات العدارية.

بينما تشكلت 17 عصابة لدى فصل بروتينات الرؤيسات العدارية الكبدية المزدوجة تراوحت كتلها الجزيئية بين 13 و125 كيلودالتون (الشكلين39 و40)، فقد كانت هناك ثمان عصائب شائعة بينهـا وبين بروتينات الرؤيسات العدارية الرئوية المزدوجة (90، 67، 58، 45، 39، 28.8، 23.4، 21.6 كيلودالتون). أما عند المقارنة مع بروتينات السائل العداري الكبدي المفصـول فـي هلامـة عديـد الأكريلاميد فقد تشاركت في العصائب ذات الكتل الجزيئية النسبية 67، 54، 27، 16 كيلودالتون، في حين تشاركت مع بروتينات السائل العداري الرئوي المزدوج في العصائب ذات الكتل الجزيئية 67، 54، 27، 22 و12 كيلودالتون)، وهذا منطقي أن يكون هناك تطابق كبير بين بروتينات الرؤيسات المعزولة كيسات الكبد والرئتين في الإصابة المزدوجة وكذلك بين بروتينـات الرؤيسـات والسـائل العداري في الإصابة الكبدية المزدوجة فقد تعود كونها تشكلت من كرات مشوكة لنفس الذرية.

كما بينت النتائج الواردة في الشكل39 والجدول5 بأنه لدى المقارنة بين الإصابة المفردة والإصابة المزدوجة تشكلت نتيجة لفصل بروتينات السائل العُداري الرئوي المفرد خمس عصائب كانت كتلها الجزيئيّة النسبية 54، 35.4، 27، 24، 21 كيلودالتون، حيث تطابقت بذلك مع نتائج فصل السائل العُداري الرئوي المزدوج في عصابتين (54، 27 كيلودالتون) واختلفت معه في ثلاث عصائب (35.4، 24، 21 كيلودالتون) إذ شكل السائل العداري الرئوي المزدوج ست عصائب (67، 54، 38، 27، 22، 12 كيلودالتون). في حين تشكلت 14 عصابة لدى فصل بروتينات الرؤيسات العُدَاريّة الرئوية المفردة (الشكلين39 و40) بلغت كتلها الجزيئيّة النسبية 17-91 كيلودالتون (الجدول6)، بينما تشكلت 13 عصابة عند فصل بروتينات الرؤيسات العُدَاريّة الرئوية المزدوجة كانت كتلها الجزيئيّة النسبية بين 21 و91 كيلودالتون، فقد تطابقت في عصابتين (91، 80 كيلودالتون)، بينما كان هناك تقارب في أربع عصائب (59.5/59، 43/42.6، 40.2/40، 25.4/25.3 كيلودالتون)، في حين اختلفت في ثماني عصائب فيما بينهما. فالاختلافات بين فصل بروتينات الكيسات العُدَاريّة في الإصابتين المفردة والمزدوجة (السائل و الرؤيسات الأولية) توحي إلى أن الإصابة بالكيسات العُدَاريّة المفردة (كيسات في الكبد دون الرئتين أو في الرئتين دون الكبد) تتشكل من ذرية تختلف عن الذرية التي تشكل الإصابة المزدوجة (الكبد والرئتين معاً)، وهذا ما يفسر وجود كيسات في الكبد بشكل رئيسي دون الرئتين أو في الرئتين بشكل رئيسي دون الكبد أو في الكبد والرئتين معاً. وتختلف بذلك عن النتائج التي حصل عليها Derbala (1998) إذ حصل على ثماني عصائب من رؤيسات الكيسات العدارية عند الحمير (157.9، 150.8، 131.2، 107.1، 89.1، 79.4، 67.6، 53.7 كيلودالتون) و12 عصابة من رؤيسات الكيسات العدارية عند الإبل (136.8، 125.9، 102.3، 89.1، 64.6، 54.9، 38، 34.7، 29.5، 26.3، 22.9، 19.9 كيلودالتون) لذلك يمكن أن يستخدم فصل مستخلص بروتينات الرؤيسات الأولية في التفريق بين ذراري الكيسات العُدَاريّة في الأنواع المختلفة (الإبل والغنم والحمير)، وهذا ما أشار إليه MacManus و Barret (1985) باستعمال الرحلان الكهربائي لبروتينات الرؤيسات الأولية لتقييم الاختلافات بشكل واضح داخل أنواع المشوكة الحبيبية للأغنام والخيل، وذكرت في العديد من الدراسات وجود ذراري متعددة، وهذا يتوافق مع Hassan (1991) إذ وجد اختلافات في النشاط البيولوجي أثناء التحليل الكيميائي الحيوي للسائل العُداري عند الإبل والخنازير والأغنام وكذلك الرؤيسات الأولية والمراحل اليرقية للدودة، موحية إلى أنها تنتمي إلى ذراري مختلفة. كما اختلفت مع نتائج Kaderi(1991) التي حصلت على العصائب نفسها لدى مقارنة ثلاثة أنواع من المستضدات (الرؤيسات، السائل، الغشاء) لثلاثة أنواع من الأثوياء المتوسطة (الأغنام والأبقار والإنسان)، إذ تحتوي الرؤيسات على أكثر من

20 عصابة أما مستخلص السائل والغشاء فيحتوي نحو 15 عصابة بعضهم شائع مثل العصابة 60 كيلودالتون.

أوضحت نتائج اختبار التبصيم المناعي أن تحت وحدات السائل العُداري الكبدي 54، 38، 27 كيلو دالتون قد أبدت فاعلية مناعية مع أمصال الأغنام المصابة بداء المشوكات الكيسيّة، في حين أبدت تحت وحدات السائل العُداري الرئوي 54، 38، 27، 22 كيلو دالتون فاعلية مناعية مع الأمصال الايجابية المرجعية الغنمية المصابة بالمشوكة الحبيبية الكيسيّة، وبذلك يمكن القول أن العصائب 54، 38، 27 والعصابة 22 كيلو دالتون يمكن أن تكون ذات أهمية تشخيصية في الاختبارات المناعية حيث تقلل من التفاعلات التصالبيّة مع أنواع الديدان الأخرى في الثوي المتوسط. وقد ذكرت العصائب ذات الكتل الجزئية النسبية 38 و 20-24 كيلو دالتون في نتائج Maddison وزملاؤه (1989) الذين سجلوا تفاعلات للأضداد في أمصال المرضى المصابين بالكيسات العُدَارِيّة مع العصائب ذات الكتل الجزيئية النسبية 12، 16، 20، 37، 38، 48 كيلودالتون، وأيضاً ذكرها Kanwar وزملاؤه (1992)، حيث تشكلت استجابة مناعية خلطية ضد 12 عصابة بروتينية، إذ تطورت الاستجابات المناعية في أمصال مرضى الكيسات العُدَارِيّة ضد العصائب 8، 16، 24، 38، 45، 58 كيلودالتون، وأشار Burgu وزملاؤه (2000) إلى أن العصابة 116 كيلو دالتون هي الأكثر نوعية عند الأغنام وأن العصابتين 8 و 68 كيلو دالتون كانتا نوعيتين عند الإنسان، وكما فصل Al-Yaman وKnobloch (1989) مستضدين من السائل العُداري هما Eg20 و Eg48، وكان المستضد Eg20 كان نوعياً أكثر من المستضد Eg48 . ويمكن أن ترجع تلك الاختلافات إلى اختلاف الذرية (النمط الوراثي) للمشوكة الحبيبية وأيضاً اختلاف مصادر السائل العُداري واختلاف الثوي المتوسط.

أما في التبصيم المناعي للكشف عن عصائب مستضدات الرؤيسات الأولية ذات الفاعلية المناعية، فلقد تفاعلت العديد من مستضدات الرؤيسات الأولية الكبديّة والرئوية مع الأمصال الايجابية المرجعية النوعية للكيسات العُدَارِيّة (الشكل45). إذ أبدت نحو تسع مستضدات للرؤيسات الأولية الكبديّة، ونحو ثماني تحت وحدات من الرؤيسات الأولية الرئوية فاعلية مناعية مع الأمصال الايجابية المرجعية النوعية للكيسات العُدَارِيّة الغنمية. وهذا بدوره يزيد من عدد المستضدات التي يمكن أن تحرض تشكل أضداد أكثر نوعية وذات تفاعلات تصالبيّة أقل.

أما من حيث التفاعل مع الأمصال وحيدة النوعية الناتجة عن تحت الوحدات ذات الفاعلية المناعية التي حصل عليها في الأرانب ومستضدات الديدان المدروسة للتفاعلات التصالبيّة في الدراسة الحالية

وذلك باستعمال التبصيم المناعي النقطي(Dot- Blot)، فقد تفاعلت الأمصال وحيدة النوعية العائدة للأرانب الممنعة بالمستضد 54 كيلو دالتون مع المستضدات الكلية للمونيزية اكسبانزا والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة في حين لم تتفاعل مع المستضدات الكلية للشريطية تيسانيزية والمتورقة الكبديّة، وبذلك توافقت مع نتائج التبصيم المناعي، بينما تفاعلت الأمصال وحيدة النوعية العائدة للأرانب الممنعة بالمستضد 38 كيلودالتون مع المستضدات الكلية للشريطية التيسانيزية والمتورقة الكبديّة بشكل قوي، وبشكل منخفض مع المونيزية اكسبانزا، في حين لم تتفاعل مع مستضدات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة. كما أن الأمصال وحيدة النوعية العائدة للأرانب الممنعة بالمستضد 27 كيلودالتون تفاعلت مع مستضدات الشريطية المونيزية اكسبانز والشريطية تيسانيزية ولم تتفاعل مع المستضدات الكلية للكيسة المذنبة دقيقة الرقبة والمتورقة الكبديّة (الشكل41) (الجدول8).

أما في اختبار التبصيم المناعي (Western blot) لتحديد تفاعل الأمصال وحيدة النوعية الناتجة عن تحت الوحدات ذات الفاعلية المناعية التي حصل عليها في الأرانب ومستضدات الديدان المدروسة للتفاعلات التصالبيّة في الدراسة الحالية، فقد تفاعلت الأمصال وحيدة النوعية العائدة للأرانب الممنعة بتحت الوحدة 27 كيلودالتون مع مستضدات الشريطية تيسانيزية في ثلاث عصائب بشكل قوي، كما تفاعلت مع الشريطية المونيزية اكسبانزا فظهرت عدة عصائب، في حين لم تتفاعل مستضدات المتورقة الكبديّة والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة مع تلك الأمصال (الشكل48) بخلاف ماسجله Al-Yaman و Knobloch (1989) بحيث شكل المستضد 48 تفاعلات تصالبية بنسبة 33% مع أمصال المرضى المصابين بداء الكيسات متعددة الحجرات.

أما الأمصال وحيدة النوعية العائدة للأرانب الممنعة بتحت الوحدة 38، فلقد تفاعلت مع مستضدات المتورقة الكبديّة والشريطية التيسانيزية، فظهرت عدة عصائب وكان التفاعل منخفضاً مع مستضدات المونيزية اكسبانزا فظهرت عصابة واحدة فقط (الشكل47). في حين تفاعلت الأمصال وحيدة النوعية المأخوذة من الأرانب الممنعة بالمستضد 54 كيلودالتون مع مستضدات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة والشريطية المونيزية اكسبانزا بشكل قوي جداً، بينما لم تتفاعل مستضدات التيسانيزية والمتورقة الكبديّة مع تلك الأمصال (الشكل46). لقد سجلت Sabry (2007) نتيجة مختلفة عن الدراسة الحالية حيث تشكلت في دراستها تفاعلات تصالبية للجزيئة 32–38 كيلودالتون مع المونيزية اكسبانزا ولم تتفاعل مع المتورقة الكبديّة، في حين تفاعلت الجزيئة 16–18 كيلودالتون مع المونيزية اكسبانزا والمتورقة الكبديّة. وهذا قد يكون بسبب اختلاف المنطقة الجغرافية واختلاف ذرية العينة العُذاريّة، إذ أنها أخذت من السائل العُذاري الرئوي للإبل من أحد مسالخ القاهرة في مصر. عموماً

لقد تتطابقت نتائج التبصيم المناعي مع نتائج التبصيم المناعي النقطي الذي استعمل المستضدات الكلية في حين اعتمد في التبصيم المناعي على مستضدات نقية مجزأة.

وقد سجلت كثيراً من الدراسات وجود تفاعلات تصالبية، إذ شكلت المشوّكات السنخية تفاعلات تصالبية بنسبة 25.8% من الحالات (Gottstein وزملاؤه، 1993). إضافة إلى ذلك، فقد سجلت Kaderi (1991) وجود تفاعلات تصالبية من خلال تعرف أمصال البشر المصابين بالمنشقات، والليشمانية، والمقوسة القندية، والسرطان على عدة عصائب. كما أبدى المستضد Ag5 تفاعلات تصالبية مع الأضداد البشرية لأنواع الشريطيات الأخرى لاسيّما المشوكة متعددة المساكن و الكيسة المذنبة الخزيرية والديدان الأخرى (Varela-Diaz وزملاؤه، 1978؛ Shepherd و McManus، 1987). وتوافقت مع Siavashi وزملاؤه (2005) فقد سجلوا وجود تفاعلات تصالبية للأمصال البشرية مع مستضدات المتورقة الكبديّة في كل من التبصيم المناعي النقطي والمقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم الشطائرية باستعمال مستضدات كيسات الكبد والرئتين الغنمية. كما سجلت تفاعلات تصالبية مع مستضدات بعض الديدان لاسيّما تحت أنواع الديدان الكبديّة متفرعة المعي المتغصنة ومع مرضى داء الكيسات المذنبة والفيلاريا والسهمية، وداء هجرة اليرقات الحشوي والتليف الكبدي والسرطان باستعمال تقنية التبصيم المناعي النقطي باستعمال المستضد الخام المعزول من السائل العُداري عند الأغنام (Swarna وParija، 2008). وتوافقت أيضاً مع النتائج التي حصل عليها Haniloo وزملاؤه(2005)، إذ سجلوا تفاعلات تصالبية مع الوحدات 27 و24 في حين تفاعلت تحت الوحدة 38 مع السهمية، كما توافقت مع Burgu وزملاؤه (2000) الذين سجلوا تفاعلات تصالبية لتحت الوحدات 38، 58، 68، 98، كيلودالتون مع الدودة المتورقة الكبدية وأيضاً مع متفرعة المعي المتغصنة (Dicrocoelium dendriticum) والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة والأسطونيات الشعرية (Trichostrongylidae) ومع تحت أنواع ديدان الكرش(البارامفستومم، Paramphistomum) والمسلكات (Trichuris). كما توافقت مع نتائج Hadighi وزملاؤه (2003)، فقد تفاعلت حالة واحدة مع المتورقة الكبديّة . وقد أشارت معظم الدراسات بأن تحت الوحدة المستضدية 8/12 و16 كانت الأكثر نوعية بين تحت الوحدات، حيث كانت الأقل فاعلية تصالبية (Kaderi، 1991؛ Haniloo وزملاؤه، 2005). ويمكن أن تفسر كل تلك الاختلافات بأنها ناتجة عن وجود ذراري مختلفة في المشوّكات أو عن المصادر المختلفة لمستحضرات المستضدات واختلاف التقانات المستخدمة ومعايرتها، إضافة إلى اختلاف أثوياء الطفيليات المذكورة آنفاً التي يمكن أن تشكل دوراً في نوعية التقانة التشخيصية المستعملة حيث اعتمدت بعض الدراسات على أمصال مجموعة من المرضى كأمصال مرجعية ايجابية (Burgu و زملاؤه، 2000؛ Siavashi

وزملاؤه، 2005؛ Haniloo وزملاؤه، 2005؛ Swarna وParija، 2008). وبما أن التفاعلات التصالبيّة تخفض من جودة الاختبارات المصلية وتنقص من كفاءتها التشخيصية، لذلك يمكن أن يقترح بأن تشكل تحت الوحدة 38 مستضداً مقبولاً للكشف عن أضداد الكيسات العُدَاريّة في الأغنام السورية ليستعمل في المسوحات المصلية لداء الكيسات العُدَاريّة، واستناداً إلى المعطيات الوبائية في سورية من جهة، التي تعد الشريطية التيسانيزية والدودة المتورقة الكبدية محدودة الانتشار، بينما تعد الشريطية المونيزية والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة ذات انتشار عالي في سورية (Al- Khaled، 1999؛ الياسين والخالد، 2008) وإلى نتائج هذه الدراسة من جهة أخرى التي أوضحت أن المتورقة الكبدية والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة تشكل قرابات مستضدية عالية مع المستضدات العُدَاريّة من خلال تلك التفاعلات التصالبية التي شكلتها.

أوضحت نتائج تقييم المستضدات في الكشف عن أضداد مستضدات الكيسات العُدَاريّة في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم باستعمال مستضدات مستفردة من السائل العُداري الكبدي في السيفادكس G-100 من الأغنام العواس المذبوحة أن أفضل تركيز للمستضد هو 1.2 مكغ/مل أي بمعدل 0.12مكغ/حفرة لتمتز على سطح الحفرة (Coating antigen) حيث شكلت أقل نسبة من التفاعلات غير النوعية، وكان انعكاس خلفية الحفرة عندها ضئيلاً، وتماثلت هذه النتائج مع نتائج زمضان (1992) إذ استخدمت تراكيز تراوحت بين 125 و 500 نانوغرام/حفرة. في حين اختلفت بشكل طفيف مع Ramtinوزملاؤه (2003) إذ استعملوا 1مكغ/حفرة وقد يعود هذا الاختلاف إلى استعمال المستضد AgBالنقي فقط الذي يمكن أن يحتاج كمية عالية منه وتكون التفاعلات غير النوعية منخفضة، وقد استعملوا الأمصال بتمديدات وصلت إلى مستوى 1:800 ، وهذه توافقت هذه النتائج مع الدراسة الحالية حيث تراوح التمديد المثالي بين 1:400 و 1:800(الشكل49). واختلفت مع Sabry (2007) إذ استعملت 2 مكغ/مل من المستضد وهذا يكون ضمن مجال المعايرة التي يمكن أن تعطي نتائج جيدة. كما استخدمت تمديد أقل من المصل (1:100)، الذي قد يكون ناتجاً عن اختلاف معايرة المستضد.

ومن جهة أخرى فقد أوضحت النتائج أن النقطة الفاصلة بين القراءات الايجابية والقراءات السلبية (Cut- off) كانت عند كثافة ضوئية (OD)= 1.3 (الشكل51) فقد كانت حساسية الاختبار عند تلك النقطة 87.5%، وبذلك تقاربت مع النتائج التي حصل عليها Hadighi وزملاؤه (2003)، Haniloo وزملاؤه (2005) إذ استعملوا مستضد خام شكل حساسية ونوعية 94%، 83% على التوالي، وأيضاً مع نتائج الياسين(2006). وهي ضمن المجال 77% و 92% الذي حصل عليه Gottstein وزملاؤه (1993)، بينما كانت أقل بشكل واضح بالمقارنة مع النتائج التي حصل عليها Sawrna و Parija (2008)، إذ تراوحت الحساسية مابين 97.1 و100%. وأيضاً أقل بكثير مما سجله Siavashi

وزملاؤه (2005) إذ حصلوا على حساسية ونوعية عالية بلغت 100% و 98.75% باستعمال التبصيم المناعي النقطي، و99.22% و98.75% بوساطة المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم الشطائرية باستعمال مستضدات من الكيسات العُدَارِيّة الكبديّة والرئوية والأغنام مع أمصال بشرية، و اختلفت أيضاً مع Rokni و Aminian (2006) لدى تقييم صلاحية تقنية EITB (Enzyme-linked Immuno-electroTransfer Blot technique) في تشخيص الكيسات العُدَارِيّة عند البشر باستعمال مستضدات السائل العُداري الغنمي فقد سجلا حساسية ونوعية باستعمال المستضد AgB والمستضد Ag5 فكانت قيمها 95%، 88.5%، 97.3%، 64.8% على التوالي. كما سجلت Sabry (2007) بأن الجزيئة 8-12 كيلو دالتون هي الأكثر نوعية (96.66%) ولم تسجل تفاعلات تصالبية مع الأمصال البشرية، وكانت حساسيتها 100% في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم، بينما كانت الجزيئة 32-38 كيلودالتون ذات نوعية أقل (93.33%) وحساسية عالية (100%). وقد تكون تلك الاختلافات في حساسيات اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم للمستضد ناتجة عن المنشأ الجغرافي للمرض(Gottstein وزملاؤه، 1993). لذلك يكون التشخيص النوعي ضعيف في خمج الأغنام الفردية من منطقة إلى أخرى، ويعتقد أن تغيرات الاستجابات الضدية في ذراري الطفيلي المختلفة لها دوراً في تشكيل هذه الاختلافات (Jenkins و Rickard، 1984). أو إلى اختلاف التقانات المتطورة المستعملة في الكشف عن الأضداد، كما أن الخمج عند الإنسان بالطفيليات أقل مما هو عند الحيوان التي يمكن أن تشكل تفاعلات تصالبية تزيد من الايجابي الكاذب. وقد تكون بسبب تتشكل استجابات ضدية ضعيفة في الحيوانات مقارنة مع مستويات الأضداد النوعية العالية نسبياً التي تشاهد في الأخماج البشرية عند الخمج بالمشوكة الحبيبية (Lightowlers و Gottstein، 1995). وهذا ما أكده Jenkins و Rickard(1986 a) إذ يمكن الكشف عن الأضداد لمختلف المستضدات بما فيها المستضد Ag5 في أمصال بعض الأغنام، كما في الإصابات البشرية. (Eckert وزملاؤه، 2001).

وفي حين كانت نوعية الاختبار في الدراسة الحالية منخفضة إذ بلغت نحو 66.66% (الجدول10) وهي المشكلة الرئيسة في الإختبارات المصلية للكشف عن الأضداد العُدَارِيّة عند الحيوان، وهي أقل مما حصل عليه Hadighi وزملاؤه (2003)، Haniloo وزملاؤه (2005)، الياسين (2006)، Sawrna و Parija (2008) حيث تراوحت مابين 83 و100% في التبصيم المناعي النقطي. وكانت منخفضة بالمقارنة مع النتيجة التي حصل عليها Ioppolo وزملاؤه(1996) إذ بلغت نحو 100% في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم مع الأضداد البشرية باستعمال المستضد AgB غير أن حساسيتها كانت منخفضة (63%)، في حين كانت النوعية منخفضة في التبصيم المناعي(58%) بحيث تقاربت مع

نتيجة الدراسة الحالية، بينما كانت حساسيته جيدة (80%). وأما استعمال بروتينات الرؤيسات الأولية والغشاء الجليدي والسائل العُداري للكشف عن أضدادها باختبار التبصيم المناعي النقطي شكلت حساسية جيدة كانت 96.66%، 86.66% و 93.33% على التوالي، في حين كانت النوعية منخفضة، إذ بلغت نحو 70% لكل المستضدات وبذلك تقاربت مع ماحصل عليه في هذه الدراسة. وقد تفسر بسبب أن مركبات السائل العُداري الغنمي تستطيع أن ترتبط مع الغلوبيلينات المناعية الغنمية بشكل غير نوعي، وبذلك تساهم في زيادة التفاعلات الايجابية الكاذبة حتى مع أمصال الحيوانات غير المخموجة بأنواع الشريطيات (Jenkins و Rickard، 1984). ويدل هذا الانخفاض على وجود تفاعلات إيجابية كاذبة بلغت نسبتها نحو 33.3%، قد تعود إلى التفاعلات التصالبيّة مع أنواع أخرى من الطفيليات، فقد سجلت مع كل من الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة –كما في الدراسة الحالية التي بلغت نسبتها نحو 36.36%– ومع الكيسة المذنبة الغنمية والشريطية المونيزية والشريطية تيسانيزية، وأيضاً الدودة المتورقة الكبدية وأنواع أخرى حيث تعطي تشخيص نوعي محدود في المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم باستعمال مستضدات الطفيلي الخام (Yong وزملاؤه، 1984؛ Jenkins و Rickard، 1984؛ Burgu وزملاؤه، 2000؛ Kittelberger وزملاؤه، 2002؛ Kandil وزملاؤه، 2004) ولهذا يكون التشخيص المصلي الدقيق لأخماج المشوّكات الكيسيّة في الحيوانات صعباً بسبب تلك التفاعلات التصالبيّة (Yong وزملاؤه، 1984؛ Lightowlers و Gottstein، 1995). وسجل أيضاً Rokni و Aminian (2006) تفاعلات تصالبيّة مع كل أمصال الأشخاص المصابين بالمتورقة الكبديّة والسهمية وداء الأسطوانيات وداء الأسطونيات الشعرية ومع الناس الأسوياء غير المصابين.

أما قيمة التنبؤ الايجابي (Positive Predictive Value, PPV) فقد بلغت نحو 81.4%، وهذا يعني أن الاختبار يستطيع أن يكشف عن 81.4% من الأغنام المصابة بداء الكيسات العُداريّة ، بينما كانت قيمة التنبؤ السلبي(Negative Predictive Value , NPV) نحو 76.2%، أي أن الاختبار يستطيع تمييز 76.2% من الأغنام غير المصابة بداء الكيسات العداري. عموماً هي أقل مما حصل عليه Hadighi وزملاؤه (2003) إذ بلغت قيمة التنبؤ الايجابي نحو 97.1%، في حين بلغت قيمة التنبؤ السالب نحو 98.5%. وكانت أيضاً أقل من قيمة التنبؤ السلبي والايجابي للمستضد AgB (86.4% و 95.5% على التوالي) بينما كانت متقاربة نوعاً ما مع المستضد Ag5 إذ بلغت 60.3% و 97.7% على التوالي (Rokni و Aminian، 2006).

إن جميع الدراسات المذكورة آنفاً طبقت على أمصال بشرية باستعمال مستضدات غنمية باستثناء دراسة الياسين(2006) التي طبقت على أمصال حيوانية في اختبار الانتشار المناعي المضاعف ومن المعروف

أن اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم أكثر حساسية من الانتشار المناعي المضاعف بحيث يمكنه الكشف عن تراكيز منخفضة جداً من الأضداد مقدرة بالنانوغرام على عكس اختبار الانتشار المناعي الذي يحتاج إلى تراكيز عالية من الأضداد، ويمكن أن يفسر ذلك بارتفاع نسبة الايجابي الكاذب في هذا الاختبار وانخفاضه في اختبار الانتشار المناعي المضاعف حيث أن الطفيليات الأخرى غالباً ما تتفاعل أضدادها تصالبياً بشكل ضعيف. وبما أن الإنسان يتعرض للإصابة بالطفيليات بشكل أقل مما هي في الحيوان، وأكثر الطفيليات التي تشكل تفاعلات تصالبية هي المشوكة متعددة المساكن(*E. multilocularis*)، والكيسات المذنبة البقرية والخنزيرية التي تشكل تفاعلات تصالبية بشكل كبير، علاوة على ذلك استخدام مستضدات أكثر نقاوة في تقنيات عالية وهذه كلها ساعدت في زيادة نسبة الحساسية والنوعية للاختبارات المصلية أكثر عند الإنسان مما هو في الحيوان. وذلك لأن المشوكة الحبيبية تعمل على تحريض الاستجابات الخلطية بشكل قوي في الإنسان، إذ تحتوي أمصال المصابين بالمشوكة الكيسيّة على كمية وافرة من الأضداد الجائلة في الدم IgG، IgM، IgA، IgE المضادة للمستضدات العُدَارِيّة، والتي يمكن أن تدوم في مصل المرضى لعدة سنوات بعد الشفاء، حيث يكون لها فائدة كبيرة في مراقبة ومتابعة المرضى، إذ تتشكل زيادة واضحة لكل من تحت الصفوف IgG1 وIgG4 (Aceti وزملاؤه، 1993؛ Wen و Craig؛ 1994).

تشير الدراسة الحالية إلى إمكانية تشخيص داء الكيسات العُدَارِيّة عند الأغنام بتقنية المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة، وضرورة توافر مستضدات عالية الاستمناعية (Antigenicity) وذات تفاعلات تصالبية منخفضة جداً.

6- الاستنتاجات (Conclusions)

- إمكانية استخدام مستضدات السائل العُداري لتشخيص الإصابة بداء الكيسات العُداريّة باستعمال تقنية المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة في الأغنام العواس، وبالرغم من أن نوعية الاختبار منخفضة، لذلك فمن الضروري البحث عن البروتينات ذات الفاعلية المستضدية العالية والتي تبدي تفاعلات تصالبية منخفضة.
- إمكانية استخدام اختباري المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم والتبضيم المناعي في المسوحات المصلية للتقصي عن داء الكيسات العُداريّة، وتقييم الواقع الصحي لانتشار المرض.
- احتمال وجود أكثر من ذرية من المشوكات الحبيبية تصيب الأغنام العواس في سورية بناء على نتائج فصل بروتينات الكيسات العدارية في الإصابة المفردة والإصابة المزدوجة في هلامة عديد الأكريلاميد بالرحلان الكهربائي.
- إمكانية اعتبار المستضد 38 كيلودالتون المستضد الرئيس في الاختبارات المصلية، وذلك بناء على المعطيات الوبائية للأمراض الطفيلية والتفاعلات التصالبيّة.

7- التوصيات (Recommendations)

- استخدام المستضدات المستفردة لاسيّما المستضد 38 كيلودالتون للكشف عن أضداد الكيسات العُذَارِيّة في المسوحات المصلية للدراسات الوبائية.
- تصنيف ذراري المشوكة الحبيبية الموجودة في سورية بتقانة تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR) بغية تحضير مستضدات نوعية.
- دراسة التفاعلات التصالبيّة لمستضدات الكيسات العُذَارِيّة مع مستضدات طفيليات أخرى مثل الكيسة المذنبة الغنمية وأنواع أخرى من الشريطيات والمثقوبات بهدف الحصول على مستضدات ذات نوعية عالية وخفض التفاعلات السلبية الكاذبة.
- دراسة خصائص التفاعلات التصالبيّة للمستضدات التي تتراوح كتلها الجزيئية النسبية بين 12 و22 كيلودالتون .
- دراسة تطوير إنتاج لقاح ضد المشوّكات الحبيبية في الأغنام والإنسان مستقبلاً.
- وضع برنامج مكافحة للسيطرة على المرض في سورية وتطبيقه على مستوى عالي من الجدية والمسؤولية.

8- الملخص باللغة العربية

يعد داء الكيسات العُدَارِيّة مرض مشترك خطير واسع الانتشار، ويسبب خسائر اقتصادية كبيرة في الأغنام. يتطلب التشخيص المصلي الدقيق للكيسات العُدَارِيّة توفر مستضدات ذات حساسية ونوعية عالية. ولأجل ذلك، كانت أهداف الدراسة الحالية هي أولاً: تحديد الجزيئات البروتينية المستضدية الرئيسة وخصائصها. ثانياً: تحديد القرابة المستضدية بين مستضدات السائل العُداري الكبدي والطفيليات الأخرى، بالاضافة إلى تقييم اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة باستعمال مستضدات السائل العُداري الكبدي المنقى جزئياً للكشف عن أضداد الكيسات العُدَارِيّة للتوصل إلى طريقة تشخيصية مصلية جديدة لتستخدم في المسوحات الوبائية المصلية عند الأغنام.

جمعت 40 عينة مصل ايجابية من أغنام مصابة بداء الكيسات العُدَارِيّة و24 عينة مصل سلبية من أغنام غير مصابة بالكيسات العُدَارِيّة، و11 عينة مصل من أغنام مصابة بداء الكيسات المذنبة دقيقة الرقبة، وحفظت في التجميد العميق في درجة حرارة −20°م. جمع السائل العُداري، والرؤيسات الأولية للكيسات العُدَارِيّة الكبديّة والرئوية التي جمعت من الأغنام العواس المذبوحة في مسالخ مدينة حماة وريف دمشق، كما جمعت ديدان كل من الشريطية تيسانيزية والشريطية المونيزية اكسبانزا والكيسة المذنبة دقيقة الرقبة، والدودة المتورقة الكبديّة .

أولاً: عزلت البروتينات المكونة للكيسات العُدَارِيّة ومستخلص الديدان الطفيلية المدروسة عن طريق الترسيب بسلفات الأمونيوم، والديلزة باتجاه الماء المقطر، والنبذ، للتخلص من البروتينات ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة، ثم تم تجزئة مستخلص البروتينيات في عمود الكروماتوغرافيا Sephadex G-100، ثم فصلها في هلامة عديد الأكريلاميد بتقنية الرحلان الكهربائي (SDS-PAGE). ثانياً: حددت العصائب ذات الفاعلية المناعية مع أضداد الكيسات العُدَارِيّة باستعمال اختبار التبصيم المناعي (Immunoblot). حقنت مستضدات السائل العُداري الكبدي ذات الفاعلية المناعية (54، 38، 27 كيلودالتون) في ثلاث مجموعات من الأرانب للحصول على الأضداد وحيدة النوعية لكل مستضد منها ثم جمعت أمصال من الأرانب قبل تمنيعها لتستخدم كشاهد سلبي. كما تم دراسة التفاعلات التصالبيّة مع مستضدات الديدان الأخرى بالتبصيم

المناعي النقطي والتبصيم المناعي. وأخيراً قيمت المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة باستخدام مستضدات السائل العُداري الكبدي المنقى جزئياً للكشف عن أضداد الكيسات العُدَاريّة.

أظهرت النتائج تفاعل ثلاث عصائب (54 و38 و27 كيلو دالتون) من تحت وحدات السائل العُداري الكبدي مع الأمصال الإيجابية المختبرة (المرجعية) للكيسات العُدَاريّة في اختبار التبصيم المناعي، بينما لم تتفاعل مع العصائب 67 و 16 كيلو دالتون. في حين تفاعلت أربع عصائب (54 و38 و28 و22 كيلو دالتون) من تحت وحدات السائل العُداري الرئوي مع أمصال الأغنام المصابة بالمشوكة الكيسيّة المرجعية، بينما لم تبد العصابتين 12 و67 كيلو دالتون أية تفاعل مع الأمصال المختبرة.

كما أوضحت نتائج التبصيم المناعي وجود قرابة مستضدية بين مستضدات السائل العُداري الكبدي ومستضدات الديدان الأخرى. تفاعلت الأمصال وحيدة النوعية لتحت الوحدة 54 كيلو دالتون تصالبياً مع مستضدات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة والمونيزية اكسبانزا، بينما تفاعلت الأمصال المنتجة بالتمنيع بتحت الوحدة 38 كيلو دالتون تصالبياً مع الشريطية تيسانيزية والمتورقة الكبديّة. في حين تفاعلت الأمصال وحيدة النوعية لتحت الوحدة 27 كيلو دالتون تصالبياً مع الشريطية تيسانيزية والشريطية المونيزية اكسبانزا.

وبينت نتائج تقييم اختبار المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم الذي أظهر حساسية ونوعية لمستضدات السائل العُداري الكبدي بلغت نحو 87.5%، و66.7% على التوالي، كما تفاعلت تصالبياً مع مستضدات الكيسة المذنبة دقيقة الرقبة بنسبة 36.36%. في حين كانت قيمة التنبؤ الايجابي 81.4% وقيمة التنبؤ السلبي 76.2%.

يستنتج من هذه الدراسة إمكانية تحت وحدات السائل العداري للكبد للكشف عن أضداد الكيسات العُدَاريّة بتقنية المقايسة المناعية المقترنة بالإنظيم غير المباشرة في الأغنام العواس باستعمال مستضدات السائل العُداري، كما يمكن استخدام المستضد38كيلودالتون في التشخيصات المصلية والمسوحات المصلية الوبائية للكيسات العُدَاريّة في الأغنام في سورية.

9- الملخص باللغة الإنكليزية (Abstract)

The *hydatidosis* is considered as a dangerous zonoosis worldwide distribution and an important economic impact in sheep. Moreover, it has been required high sensitive and specific antigens for accurate serodiagnosis.

For this, the aims of present study were firstly, to identify the major protein molecules and their characteristics and antigencity reactivity antigens, secondly, to determine the antigenic relations between hydatid fluid antigens and other parasites. In addition, to evaluate indirect ELISA method using partial purified hepatic hydatid fluid antigens in order to improve a new serodiagnostic method will be used in seroepidemiology surveys in sheep.

Forty positive sera samples were collected from infected sheep with hydatidosis, and 24 sera samples from uninfected sheep, and 11 samples from infected sheep with *Cysticercosis tenuicollis*. Samples kept in deep freeze at -20°C. Fluids', protoscolecs liver and lungs hydatid cysts were collected from slaughtered sheep in Hama and countryside Damascus. As will as, the following species *T. thysaniesia*, *Moniezia Expansa* and *Fasciola hepatica*, and *C. tenuicoillis* were also collected.

Firstly, the antigenic proteins of hydatid cysts and studied extracts of worms were isolated using precipitation method with Ammonium sulfate, then centrifugation, and dialysis against distilled and deionized water. And then fractionation on sephadex G-100 column, for disposing proteins have low molecular weight, then separating it by SDS- PAGE. In the second step, Western blot method was carried out to identify the specific bands that posses antigenic reactivity toward *hydatidosis* antibodies. To obtain mono specific sera, three groups of rabbits were individually immunized by the subunits of the 54, 38 and 27 KDa. Befor immunizing the rabbits by injecting the antigens were collected sera and used as negative control. The cross reactions with other worms were studied using both immuno blot and Dot- Blot techniques. Finally, indirect ELISA method was evaluated using partially purified antigens of hepatic *Hydatid* fluid and antibodies against *hydatidosis*.

The results had showed that the subunits of hepatic hydatid fluid of 54, 38 and 27 KDa bands reacted with reference positive sera using immunoblotting

technique, while the 67 and 16 KDa bands did not react. On the other hand, it is also found that the subunits of lung *Hydatid* fluid in the weight 22, 28, 38 and 54KDa reacted with reference sera taken from sheep with Cystic *Echinococcosis*, while both bands 12 and 67KDa didn't react with tested sera.

The results of immuno blotting technique demonstrated that there were antigenic relations between antigens of liver hydatid cysts fluid and other worms. The mono specific sera induced by subunit of 54KDa cross-reacted with antigens of *C.tenuicoillis* and *Moniezia expansa*, while, mono specific sera induced by 38 KDa antigen strongly cross-reacted with antigens of *T.thysaniesia* and *Fasciola Hepatica*. On the other hand, serum induced by 27 KDa antigen reacted with antigens of *T. thysaniesia* and *Moniezia Expansa*.

The results showed that the sensitivity and specificity of indirect ELISA test using hepatic hydatid fluid antigens were found to be 87.5%, 66.7% respectively. The cross-reactions with *C.tenuicollis* were found to be 36.36%. Whereas, positive predictive value was 81.4%, while the negative predictive value was 76.2%.

It can be concluded that, it is possible to detect hydatid cyst antibodies using indirect- ELISA in Awassi sheep using hydatid fluid antigens, as well as, it is proposed that subunit 38 KDa is satisfactory antigen to be used in serodiagnosis and epidemic sera-surveys *hydatidosis* in Syrian sheep.

10- المراجع

-المراجع العربية-

الخالد، عبد الكريم، 2001. الكيسة العُدّاريّة والكيسة المذنبية دقيقة الرقبة في الأغنام والماعز في سورية، مجلة دمشق للعلوم الزراعيّة. 17(2):28-36.

الخالد، عبد الكريم، 2002. الشريطيات(القليديات) في : المقداد، عبد الرزاق؛ محمد محسن قطرنجي؛ عبد الكريم الخالد، علم الطفيليّات-1(2002)، منشورات جامعة البعث- كلّيّة الطب البيطري، مديريّة الكتب والمطبوعات الجامعيّة (436).

المقداد، عبد الرزاق، 1991. علم الطفيليّات، الجزء الأول، منشورات جامعة البعث- كلّيّة الطب البيطري، مديريّة الكتب والطبوعات الجامعيّة(361).

الياسين، عبد المنعم. 2006. عزل مستضدات الكيسات العُذاريّة عند الأغنام العواس في الجمهورية العربية السورية. رسالة ماجستير، جامعة البعث (132).

الياسين، عبد المنعم، وعبد الحي كروالي، 2011. انتشار الكيسات العُذاريّة في الاغنام العواسي في المسالخ الفنية في سورية، المجلة العربية للبيئات الجافة. (4)1: 15-123.

الياسين، عبدالمنعم و عبد الكريم الخالد، 2008. تأثير الترحال على انتشار طفيليّات المعدة والأمعاء عند الأغنام العواس في المناطق الرعوية في محافظة حماة. المجلة العربية للبيئات الجافة، 1(1):11-17.

بارودي، عامر. 1990. دراسة عن انتشار داء الكيسات المائيّة في الحيوانات المذبوحة في سورية، رسالة ماجستير، كليّة الطب البيطري- جامعة البعث (155).

برطال م، المجاد ز.، عطاف.أ، 1983. دراسة وبائيّة لمرض الأكياس المائيّة في الإنسان والحيوان في المملكة المغربيّة، ندوة اتحاد مجالس البحث العلمي العربيّة عن الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان. الرباط- المغرب: 231-241.

حسين، ربيع السيد صالح، 1997- الأمراض التي تنتقل من الحيوان إلى الإنسان (الأمراض المشتركة). الرياض، جامعة الملك سعود.

رمضان، ميسون. 1992. دراسة مناعيّة عن المشوكة الحبيبيّة لدى الأشخاص المصابين بالكيسات العُذاريّة. رسالة ماجستير، كلّيّة العلوم- جامعة دمشق(129).

عدوي، أحمد طلعت، 1998. الأمراض المشتركة بين الإنسان و الحيوان، القاهرة الدار المصريّة اللبنانيّة، الجزء الثاني.

عيد، محمد، 2005. التقصي الوبائي لداء الكيسات العُذاريّة في سورية، رسالة ماجستير، كلّيّة الطب البيطري جامعة البعث(206).

مجذوب، محمد أحمد، 2000. علم الطفيليّات البيطري.، ترجم عن ايركهارت، ج . م.، أرمر، ج.، دنكسن،ج.ل.، إصدار جامعة الملك سعود 1424 هـ.

- المراجع الأجنبية -

Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature. 383:787–793.

Aceti, A., A. Pennica, A. Teggi, L. M. Fondacaro, M. Caferro, O. Leri, G. Tacchi, D. Celestino, G. Quaranta, F. De Rosa, and A. Sebastani. 1993. IgG subclasses in human hydatid disease: prominence of the IgG4 response. Int.Arch. Allergy Immunol. 102:347–351.

Al- Khaled, Ak., 1999. A study on the prevalence of the gastro- intestinal – helminthes and some endoparasites in sheep, Damascus University Journal for the Agricultural sciences, 15:63-80.

Ali, M.A.H., 1993. Studies on some tissue Parasites of Master of Science thesis, Assiut Uviversity, Egypt.

Ali-Khan, Z., and R. Siboo. 1980a. Pathogenesis and host response in subcutaneous alveolar hydatidosis. I. Histogenesis of alveolar cyst and a qualitative analysis of the inflammatory infiltrates. Z. Parasitenkd. 62:241–254.

Ali-Khan, Z., and R. Siboo. 1980b. Pathogenesis and host response in subcutaneous alveolar hydatidosis. II. Intense plasmacellular infiltration in the paracortex of draining lymph nodes. Z. Parasitenkd. 62:255–265.

Al-Khalidi, N. W., and O. O. Barriga. 1986. Cell-mediated immunity in the prepatent primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus.* Vet. Immunol. Immunopathol. 11:73–82.

Allan, J. C., P. S. Craig, J. Garcia Noval, F. Mencos, D. Liu, Y. Wang, H. Wen, P. Zhou, R. Stringer, M. Rogan, and E. Zeyhle. 1992. Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. Parasitology 104:347–356.

Allen, J. E., and R. M. Maizels. 1996. Immunology of human helminth infection. Int. Arch. Allergy Immunol. 109:3–10.

Al-Yaman, F. M., and J. Knobloch. 1989. Isolation and partial characterization of species-specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. Mol. Biochem. Parasitol. 37:101–107.

AL-Yaman, F. M., L., Assaf, N., Hailat, and Sk., Abdel-Hafez, 1985. Prevalence of hydatidosis in slaughtered animal from North Jordan. Ann Trop Med Prasitol. 79(5):501-506.

Amelio, D., R. O. Pontesilli, R. Dayal, F. de Rosa, M. Barmet, A. Teggi, G. Brighhouse, and P.H. Lambert, 1985. Characterization of parasite antigens from human hydatid cyst fluid by SDS-page and IEF. Springer- Verlag.

Aminzhanov, M. 1980. Immunoprophylaxis of hydatidosis in animals. Tr. Uzbek. Nauchno-Issled. Inst. Vet. 30:15–18.

Ammann, R., K. Tschudi, M. von Ziegler, F. Meister, J. Cotting, J. Eckert, F. Witassek, and A. Freiburghaus. 1988. The long-term course of 60 patients with alveolar echinococcosis in continuous therapy with mebendazole (1976–85). Klin. Wochenschr. 66:1060–1073.

Andersen, F.L., H. Ouhelli, M. Kachani, 1997. Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and in Middle Eastern countries with special reference to Morocco.

Archer, G. T., J. E. Robson, and A. R. Thompson. 1977. Eosinophilia and mast cell hyperplasia induced by parasite phospholipid. Pathology, 9:137– 153.

Arend, A.C., Zaha, A., Ayala, F.J., Haag, K.L., 2004. The Echinococcus granulosus antigen B shows a high degree of genetic variability. Experimental Parasitology, 108:76–80.

Arene, F.O., 1985. Prevalence of hydatid cysts in domestic livestock in the Niger Delta, Trop. Anim. Health. Prod. 17(1):3-5.

Arias Irigoyen, J., and C. J. S. Sanchez. 1995. Toxocariasis: a cause of hyper IgE and eosinophilia. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 5:232-234.

Babba, H., A. Messedi, S. Masmoudi, M. Zribi, R. Grillot, P. Ambriose- Thomas, I. Beyrouti, and Y. Sahnoun. 1994. Diagnosis of human hydatidosis: comparison between imagery and six serologic techniques. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50:64–68.

Barbieri, M., S. Sterla, J. Battistoni, and A. Nieto. 1993. High performance latex reagent for hydatid serology using an *Echinococcus granulosus*. Lipoprotein antigen fraction purified from cyst fluid in one step. Int. J. Parasitol. 23:565–572.

Barbieri, M., V. Fernandez, G. Gonzalez, V. M. Luaces, and A. Nieto. 1998. Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. Parasite Immunol. 20:51–61.

Baron, R. W., and C. E. Tanner. 1977. *Echinococcus multilocularis* in the mouse: the in vitro protoscolicidal activity of peritoneal macrophages. Int. J. Parasitol. 7:489–495.

Barriga, O. O., and N. W. Al-Khalidi. 1986. Humoral immunity in the prepatent primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*. Vet. Immunol. Immunopathol. 11:375–389.

Battelli, G., A. Mantovani, A. Seimenis, 2002. Cystic Echinococcosis and the Mediterranean Region: along –lasting association. Parassitologia. 44:43-57.

Bauder, B., H. Auer, F. Schilcher, C. Gabler, T. Romig, B. Bilger, and H. Aspock. 1999. Experimental investigations on the B and T cell immune response in primary alveolar echinococcosis. Parasite Immunol. 21:409– 421.

Baveja, U. K., S. Basak, and T. K. Thusoo. 1997. Immunodiagnosis of human hydatid disease. J. Commun. Dis. 29:313–319.

Baz, A., A. Richieri, A. Puglia, A. Nieto, and S. Dematteis. 1999. Antibody response in CD4-depleted mice after immunization or during early infection with *Echinococcus granulosus*. Parasite Immunol. 21:141–150.

Bekele, T., E. Mukasa- Mugerwa, O.B. Kasali, 1988. The Prevalence of Cysticercosis and Hydatidosis in Ethiopian Sheep. Vet. Parasitol. 28 (3):267-70.

Bell, R. G. 1996. IgE, allergies and helminth parasites: a new perspective on an old conundrum. Immunol. Cell Biol. 74:337–345.

Bendixsen, T., D. L. Emery, and W. O. Jones. 1995. The sensitization of mucosal mast cells during infections with *Trichostrongylus colubriformis* or *Haemonchus contortus* in sheep. Int. J. Parasitol. 25:741–748.

Bortoletti, G., F. Gabriel, V. seu, C. Palmas, 1990. Epidemiology of hydatid disease in Sardinia: Astudy of fertility of cysts in sheep. J Helminthol. 64(3):212-6.

Bortoletti, G., S. Capra, C. Palmas, F. Gabriel, 1989. Distribution of ovine hydatidosis in Sardinia, 1987-1988. parasitologia. 31(2-3):251-7.

Bout, D., J. Fruit et A. Capron, 1974. Purification d ún antigéne spécifique de liquide hydatique, Ann. Immunnol, (Inst.pasteur),125C,775-788.

Bresson-Hadni, S., J. J. Laplante, D. Lenys, P. Rohmer, B. Gottstein, P. Jacquier, P. Mercet, J. P. Meyer, J. P. Miguet, and D. A. Vuitton. 1994. Seroepidemiologic screening of *Echinococcus multilocularis* infection in a European area endemic for alveolar echinococcosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51:837–846.

Burgu, A., A.Doúanay, B. G.Nen, H. O. Sarimehmetoúlu, F. Kalinbacak , 2000. Analysis of Fluids of Hydatid Cysts from Sheep by SDS-PAGE, and Determination of Specific Antigens in Protein Structure by Western Blotting, Turk J Vet Anim Sci. 24 : 493-500.

Butterworth, A. E. 1984. Cell-mediated damage to helminths. Adv. Parasitol. 23:143–235.

Cabrera, P.A., S. Lloyd, G. Haran, L. Pineyro, S. Partietti, M.A. Gemmell, O. Correa, M. A. Morana, S. Valledor, 2001. Control of *Echinococcus Granulosus* in Uruguay: Evalution of different treatment intervals for Dogs. Veterinary Parasitology. 103: 333- 304.

Capron, A., A. Vernes, and J. Biguet, 1967. Le diagnostic immunoelectrophoretique de L`hydatidose. Journées Lyonnaises de L` hydatidologie.

Capron, A., and J. P. Dessaint. 1992. Immunologic aspects of schistosomiasis. Annu. Rev. Med. 43:209–218.

Capron.A, L., Yarzabal, A. Vernes et J. Fruit, 1970. Le Diagnostic Immunoloagique de L' échinococcose humaine (Bilan personnel A propose de 400 observation) Path. Biol., 18 (7-8): 357-365.

Carmena D., A.Benito, E. Eraso, 2006. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update, Acta Tropic. 98 : 74–86.

Chamekh, M., B. Facon, C. Dissous, A. Haque, and A. Capron. 1990. Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease. J. Immunol. Methods. 134:129–137.

Chemale, G., K.L. Haag, H.B. Ferreira, A. Zaha, 2001. *Echinococcus* granulosus antigen B is encoded by a gene family. Molecular and Biochemical Parasitology. 116: 233–237.

Chemtai, A. K., G. B. Okelo, and J. Kyobe. 1981. Application of immunoelectrophoresis (IEP5) test in the diagnosis of human hydatid disease in Kenya. East Afr. Med. J. 58:583–586.

Chi, P., W. Zhang, Z. Zhang, M. Hasyet, F. Liu, Z. Ding, F. L. Andersen, H. D. Tolley, and P. M. Schantz. 1990. Cystic echinococcosis in the Xinjiang/Uygur Autonomous Region, People's Republic of China. I. Demographic and epidemiologic data. Trop. Med. Parasitol. 41:157–162.

Chordi, A., and I. G. Kagan. 1965. Identification and characterization of antigenic components of sheep hydatid cyst fluid by immunoelectrophoresis. J. Parasitol. 51:63–71.

Chow, C., C. G. Gauci, A. F. Cowman, and M. W. Lightowlers. 2001. A gene family expressing a host-protective antigen of *Echinococcus granulosus*. Mol. Biochem. Parasitol. 118:83–88.

Clutterbuck, E. J., E. M. Hirst, and C. J. Sanderson. 1989. Human interleukin- 5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GMCSF. Blood 73:1504–1512.

Conchedda, M., E. Gabriele, G.Bortoletti, 2004. Immunobiology of cystic *Echinococcosis*. Parassitologia. 46, 375–380.

Craig, P. S. 1986. Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay. Parasite Immunol. 8:171–188.

Craig, P. S., C. N. Macpherson, D. L. Watson-Jones, and G. S. Nelson. 1988. Immunodetection of *Echinococcus* eggs from naturally infected dogs and from environmental contamination sites in settlements in Turkana, Kenya. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82:268–274.

Craig, P. S., E. Zeyhle, and T. Romig. 1986. Hydatid disease: research and control in Turkana. II. The role of immunological techniques for the diagnosis of hydatid disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80:183–192. VOL. 16, 2003 Immunology And Diagnosis Of Hydatid Disease 31Downloaded from cmr.asm.org by on June 6, 2010.

Craig, P.S.,, , M.T. Rogan and C.J. Allan, 1995. Hydatidosis and cysticercosis larval cestodes. In: *Medical Parasitology* (Gillesrie, S.H. and Hawkey, P.M. eds.), Oxford University, Oxford, UK. pp. 209-239.

Craig, P. S., M. T. Rogan, and J. C. Allan. 1996. Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. Adv. Parasitol. 38:169– 250.

Craig, P.S., McManus, D.P., Lightowlers, M.W., Chabalgoity, J.A., Garcia, H.H., Gavidia, C.M., Gilman, R.H., Gonzalez, A.E., Lorca, M., Naquira, C., Nieto, A., Schantz, P.M., 2007. Prevention and control of cystic echinococcosis. Lancet Infect. 7: 385–394.

Crowther, R J., 2009. Methods in molecular biology:The ELISA guidebook. Human press, second edition(566).

Dada, B. J., and E. D. Belino. 1981. Immunization of sheep against cystic hydatidosis with homologous and heterologous metacestode antigens. Int. J. Zoonoses. 8:20–25.

Dada, B.J.O., D.S. Adegboye, And A.N. Mohammed, 1979. The Epidemiology of Echinococcus infection in Kaduna State, Nigeria. Veterinary Record. 104:312-313.

Daeki, A. O., P. S. Craig, and M. K. Shambesh. 2000. IgG-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. Ann. Trop. Med. Parasitol. 94:319–328.

Dai, W. J., B. Gottstein. 1999. Nitric oxide-mediated immunosuppression following murine *Echinococcus multilocularis* infection. Immunology. 97:107–116.

Dajani, Y.F., and F.H. Khalaf, 1981. Hyadatidosis and Tenuicollosis in sheep and goats of Jordan:Acomparative study.Ann. Trop. Medi. Parasitology. 75:175-179.

Dakkak, A., H. Ouhelli, N. Khallaayoune, k.Hommani, 1983. Resultates Den guetes Sur l΄infestation Des petits Ruminants Dans 4 rgions du maroc.Fed. of Arab scien. Res. Councils Symp. On zoon. Dise. Rabat-Morocco. 1:41-44.

De Rosa, F., S. Dottorini, and S. Pauluzzi. 1977. Vaccination against experimental peritoneal hydatid disease of BALB/C mice with hydatid fluids and their fractions. Ann. Sclavo 19:470–477.

De Rycke, P. H., and E. Pennoit-de Cooman. 1973. Experimental secondary echinococcosis of *Echinococcus granulosus.* IV. Vaccination of host mice. Z. Parasitenkd. 42:49–59.

Dematteis, S., A. Baz, M. Rottenberg, C. Fernandez, A. Orn, and A. Nieto. 1999. Antibody and Thl/Th2-type responses in BALB/c mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protoscoleces. Parasite Immunol. 21:19–26.

Dempster, R. P., M. V. Berridge, G. B. Harrison, and D. D. Heath, 1991. *Echinococcus granulosus:* development of an intermediate host mouse model for use in vaccination studies. Int. J. Parasitol. 21:549–554.

Deplazes, P., and J. Eckert. 1996. Diagnosis of the *Echinococcus multilocularis* infection in final hosts. Appl. Parasitol. 37:245–252.

Deplazes, P., B. Gottstein, J. Eckert, D. J. Jenkins, D. Ewald, and S. Jimenez-Palacios. 1992. Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme- linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. Parasitol. Res. 78:303–308.

Deplazes, P., P. Alther, I. Tanner, R. C. Thompson, and J. Eckert. 1999. *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in fox, dog, and cat populations. J. Parasitol. 85:115– 121.

Deplazes, P., R. C. Thompson, C. C. Constantine, and W. J. Penhale. 1994b. Primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus:* systemic and local (Peyer's patches) immune responses. Vet. Immunol. Immunopathol. 40: 171–184.

Deplazes, P., S. Jimenez-Palacios, B. Gottstein, J. Skaggs, and J. Eckert. 1994a. Detection of *Echinococcus* coproantigens in stray dogs of northern Spain. Appl. Parasitol. 35:297–301.

Derbala, A. A., 1998. Electrophoretic differentiation of soluble antigens from *Echinococcus granulosus* isolates using SDS-PAGE technique.Giza, Vet.med.J. 46(3):285-292.

Dessaint, J. P., D. Bout, P. Wattre, and A. Capron. 1975. Quantitative determination of specific IgE antibodies to *Echinococcus granulosus* and IgE levels in sera from patients with hydatid disease. Immunology 29:813– 823.

Diaz, A., F. Irigoin, F. Ferreira, and R. B. Sim. 1999. Control of host complement activation by the *Echinococcus granulosus* hydatid cyst. Immunopharmacology. 42:91–98.

Douch, P. G., P. E. Morum, and B. Rabel. 1996b. Secretion of anti-parasite substances and leukotrienes from ovine gastrointestinal tissues and isolated mucosal mast cells. Int. J. Parasitol. 26:205–211.

Douch, P. G., R. S. Green, J. F. Huntley, and P. L. Risdon. 1996a. Serum mast cell proteinase responses of sheep to challenge with *Trichostrongylus colubriformis* and the effect of dexamethasone treatment. Int. J. Parasitol. 26:91–95.

Eckert J., M.A. Gemmell, F.X. Meslin and Z.S. Pawłowski , 2002. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A public health Problem of Global Concern.

Eckert J., P. Deplazes, 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of *echinococcosis*, a zoonosis of increasing concern. Clin. Microbiol. Rev. 17:107–135.

Eckert, J., P. Deplazes, P. S. Craig, M. Gemmell, B. Gottstein, D. Heath, D. J. Jenkins, M. Kamiya, and M. Lightowlers, 2001. Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment, p. 72–99. *In* J. Eckert, M. A. Gemmell, F.-X. Meslin, and Z. S. Pawlowski (ed.), WHOI/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a

public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health, Paris, France.

El-Shehabi, F. S., S. A. Kamhawi, P. M. Schantz, P. S. Craig, and S. K. Abdel-Hafez. 2000. Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen detection with necropsy in stray dogs and red foxes from northern Jordan. Parasite 7:83–90.

Emery, I., C. Leclerc, R. Houin, D. A. Vuitton, and M. Liance, 1997a. Lack of H-2 gene influence on mouse susceptibility to secondary alveolar echinococcosis. Int. J. Parasitol. 27:1433–1436.

Emery, I., M. Liance, and C. Leclerc. 1997b. Secondary *Echinococcus multilocularis* infection in A/J mice: delayed metacestode development is associated with Th1 cytokine production. Parasite Immunol. 19:493–503.

Emery, I., M. Liance, E. Deriaud, D. A. Vuitton, R. Houin, and C. Leclerc. 1996. Characterization of T-cell immune responses of *Echinococcus multilocularis*-infected C57BL/6J mice. Parasite Immunol. 18:463–472.

Euzeby, J., 1982. De la biologie des "Taenias echinocoques" l' etiologie et l' epidemiologie d' hydatidose de l' homme.Revista de Medicale Veterinaire. 133:83-84.

Facon, B., M. Chamekh, C. Dissous, and A. Capron. 1991. Molecular cloning of an *Echinococcus granulosus* protein expressing an immunogenic epitope of antigen 5. Mol. Biochem. Parasitol. 45:233–239.

Fadwa, M.A., and J. Knobloch, 1989. Isolation and partial characterization of species-specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid, Mol. Biochem. Parasitol. 37:101-108.

FAO / UNEP / WHO, 1981. Guidelines for Surveillance Prevention and Control of Echinococcosis/ Hydatidosis, J. Eckert, M.A . Gemmell and E.J.L. Soulsby(eds.). World Health Orrganization, Geneva, Switzerland, VPH/ 81.28,(147).

FAO/UNEP/WHO, 1982. *Echinococcus/hydatidosis:* surveillance, prevention and control. guidelines. FAO Animal Production and Health Paper No. 29. Rome- Italy.

Fauser, S., P.Kern, 1997. T-lymphocyte cytokine mRNA expression in cystic *Echinococcosis*. Acta Tropica. 64: 35–51.

Fernandez, V., H. B. Ferreira, C. Fernandez, A. Zaha, and A. Nieto. 1996. Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. Mol. Biochem. Parasitol. 77:247–250.

Ferragut, G., I. Ljungstrom, and A. Nieto, 1998. Relevance of circulating antigen detection to follow-up experimental and human cystic hydatid infections. Parasite Immunol. 20:541–549.

Finkelman, F. D., E. J. Pearce, J. F. Urban, Jr., and A. Sher, 1991. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. Immunol. Today 12:A62–A66.

Fotiadis, C., C. Sergiou, J. Kirou, T. G. Troupis, J. Tselentis, P. Doussaitou, V. G. Gorgoulis, and M. N. Secha, 1999. Experimental *Echinococcus* infection in the mouse model: pericystic cellular immunity reaction and effects on the lymphoid organs of immunocompetent and thymectomized mice. In Vivo 13:541–546.

Frosch, P. M., C. Geier, F. J. Kaup, A. Muller, and M. Frosc, 1993. Molecular cloning of an echinococcal microtrichal antigen immunoreactive in *Echinococcus multilocularis* disease. Mol. Biochem. Parasitol. 58:301– 310.

Frosch, P., M. Hartmann, F. Muhlschlegel, and M. Frosch, 1994. Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. Mol. Biochem. Parasitol. 64:171–175.

Garraud, O., R. Perraut, G. Riveau, T.B. Nutman, 2003. Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. Trends in Parasitology 19:300–304.

Gasser, R. B., D. J. Jenkins, D. D. Heath, and S. B. Lawrence. 1992. Use of *Echinococcus granulosus* worm antigens for immunodiagnosis of *E. granulosus* infection in dogs. Vet. Parasitol. 45:89–100.

Gasser, R. B., M. W. Lightowlers, M. D. Rickard, R. A. Lyford, and H. J. Dawkins, 1990. Serological screening of farm dogs for *Echinococcus granulosus* infection in an endemic region. Aust. Vet. J. 67:145–147.

Gauci, C., M. Merli, V. Muller, C. Chow, K. Yagi, U. Mackenstedt, and M. W. Lightowlers, 2002. Molecular cloning of a vaccine antigen against infection with the larval stage of *Echinococcus multilocularis.* Infect. Immun. 70:3969–3972.

Gemmell, M. A., 1962. Natural and acquired immunity factors interfering with development during the rapid growth phage of *Echinococcus granulosus* in dogs. Immunology. 5:496–503.

Gemmell, M. A., 1966. Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. IV. Species specificity of hexacanth embryos in protecting sheep against *Echinococcus granulosus.* Immunology. 11:325– 335.

Gemmell, M.A., 1977. Taeniidae: Modification to life span of egg and the regulation of tape worm infection. Experimental parasitology. 41:314-328.

Gill, H. S., 1969. Vaccination trials against *Echinococcus granulosus* infection in dogs. J. Commun. Dis. 1:258–261.

Godot, V., S. Harraga, M. Deschaseaux, S. Bresson-Hadni, B. Gottstein, D. Emilie, and D. A. Vuitton, 1997. Increased basal production of interleukin- 10 by peripheral blood mononuclear cells in human alveolar echinococcosis. Eur. Cytokine Netw. 8:401–408.

Gonzalez, G., A. Nieto, C. Fernandez, A. Orn, C. Wernstedt, and U. Hellman, 1996. Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. Parasite Immunol. 18:587–596.

Gonzalez, G., P. Spinelli, C. Lorenzo, U. Hellman, A. Nieto, A. Willis, and G. Salinas, 2000. Molecular characterization of P-29, a metacestode-specific component of *Echinococcus granulosus* which is immunologically -related to, but distinct from, antigen 5. Mol. Biochem. Parasitol. 105:177–184.

Gonzalez-Sapienza, G., C. Lorenzo, and A. Nieto, 2000. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B. J. Clin. Microbiol. 38:3979–3983. 32 Zhang et al. Clin. Microbiol. Rev. Downloaded from cmr.asm.org by on June 6, 2010.

Gottstein, B., 1984 .An immunoassay for the detection of circulating antigen in human Echinicoccus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33(6) :1185-1191.

Gottstein, B., 1985. Purification and characterization of a specific antigen from *Echinococcus multilocularis.* Parasite Immunol. 7:201–212.

Gottstein, B., 1992. *Echinococcus multilocularis* infection: immunology and immunodiagnosis. Adv. Parasitol. 31:321–380.

Gottstein, B., P. Deplazes, J. Eckert, B. Muller, E. Schott, O. Helle, P. Boujon, K. Wolff, A. Wandeler, U. Schwiete, and H. Moegl, 1991. Serological (Em2-ELISA) and

parasitological examinations of fox populations for *Echinococcus multilocularis* infections. Zentlbl. Veterinaermed. Reihe B. 38:161–168.

Gottstein, B., P. Jacquier, S. Bresson-Hadni, and J. Eckert, 1993. Improved primary immunodiagnosis of alveolar echinococcosis in humans by an enzyme- linked immunosorbent assay using the Em2plus antigen. J. Clin. Microbiol.31:373–376.

Guerret, S., D. A. Vuitton, M. Liance, C. Pater, and J. P. Carbille, 1998. *Echinococcus multilocularis:* relationship between susceptibility/resistance and liver fibrogenesis in experimental mice. Parasitol. Res. 84:657–667.

Guerri, M. L., M. Davila, M. Rodriguez, F. Javier Nieto, and C. Ladron de Guevara, 2000. Utility of IgG subclasses in the diagnosis and follow up of hydatidosis. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 18:262–2666.

Gusbi, A.M., M.A. Awan, W.N. Beesley, 1987. Echinococcosis in Libya.II. Prevalence of hydatosis (*Echinococcus granulosus*) in sheep. Ann. Trop. Med. Parasitology. 81(1):35-41.

Haag, K.L., L. Alves-Junior, A.Zaha, F.J. Ayala, 2004. Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the Echinococcus granulosus antigen B gene family. Gene. 33:157–167.

Haag, K.L., P. Zanotto, L. Alves-Junior, R.B. Passer, A. Zaha, F.J. Ayala, 2006. Searching for antigen B genes and their adaptative sites in distinct strain and species of the helminth Echinococcus. Infection, Genetics and Evolution 4, 251–261.

Hadighi R., F. Mirhadi, B. Rokni, 2003. Evaluation of Adot-ELISA for the serodiagnosis of human *Hydatid* disease, Pak. J. Med. Sci., 19(4):268-271.

Hamel, k.L., D.R Ris, 1982. The use of acathodic antigen the immunoelectrophoretic serodiagnosis of *Echinococcus granulosus* in sheep. Vet. Immunopathol.jul., 3(4):419-425.

Haniloo. A., J. Massoud, MB. Rokni, 2005. Evaluation and comparison of antigen B-ELISA and antigen B-immunoblotting in immunodiagnosis of cystic Hydatid disease, Pak J Med Sci., 21 (3): 352-356.

Haralabidis, S., E. Karagouni, S. Frydas, and E. Dotsik, 1995. Immunoglobulin and cytokine profile in murine secondary hydatidosis. Parasite Immunol. 17:625–630.

Harnett, W., 2005. Parasite modulation of the immune response. Parasite Immunology. 27:357–359.

Hassan S. D.A., 1991. Further studies on possible differences between Echinococcus granulosus substrains through biochemical analysis of electrolytes, lipids and other components of the larval and and adult stages of parasites, Ph. B. thesis. Fac. Vet. Med. Cairo univ.

Haynes, A. P., and J. Fletcher, 1990. Neutrophil function tests. Baillieres Clin. Haematol. 3:871–887.

Heath, D. D., 1986. Immunobiology of *Echinococcus granulosus,* p. 164–188. *In* R. C. A. Thompson (ed.), The biology of *Echinococcus* and hydatid disease. George Allen and Unwin, London, United Kingdom.

Heath, D. D., 1995. Immunology of *Echinococcus* infections, p. 183–232. *In* R. C. A. Thompson and A. J. Lymbery (ed.), The biology of *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

Heath, D. D., and B. Holcman, 1997. Vaccination against *Echinococcus* in perspective. Acta Trop. 67:37–41.

Heath, D. D., and S. B. Lawrence, 1996. Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of protective molecules. Parasite Immunol. 18:347–357.

Heath, D. D., B. Holcman, and R. J. Shaw, 1994. *Echinococcus granulosus:* the mechanism of oncosphere lysis by sheep complement and antibody. Int. J. Parasitol. 24:929–935.

Heath, D. D., S. B. Lawrence, and W. K. Yong, 1992. *Echinococcus granulosus* in sheep: transfer from ewe to lamb of "Arc 5' antibodies and oncosphere- killing activity, but not protection. Int. J. Parasitol. 22:1017–1021.

Heath, D. D., S. N. Parmeter, P. J. Osborn, and S. B. Lawrence, 1981. Resistance to *Echinococcus granulosus* infection in lambs. J. Parasitol. 67: 797–799.

Helbig, M., P. Frosch, P. Kern, and M. Frosch. 1993. Serological differentiation between cystic and alveolar echinococcosis by use of recombinant larval antigens. J. Clin. Microbiol. 31:3211–3215.

Herd, R. P., 1976. The cestocidal effect of complement in normal and immune sera in vitro. Parasitology. 72:325–334.

Herd, R. P., R. J. Chappel, and D. Biddell, 1975. Immunization of dogs against *Echinococcus granulosus* using worm secretory antigens. Int. J. Parasitol. 5:395–399.

Hernandez, A., and A. Nieto, 1994. Induction of protective immunity against murine secondary hydatidosis. Parasite Immunol. 16:537–544.

Hernandez, A., R. Borras-Salvador, and A. Mir-Gisbert, 1997. Analysis of cytokine and specific antibody profiles in hydatid patients with primary infection and relapse of disease. Parasite Immunol. 19:553–561.

Himonas, C., K., Antoniado-Sotiriadou, E. Papadopoulos, 1994. Hydatidosis of food animal in Greece: Prevalence of cysts containing viable protoscoleces, j. helminthology. 68(4):311-3.

Ioppolo, S., S. Notargiacomo, E. Profumo, C. Franchi, E. Ortona, R. Rigano, and A. Siracusano, 1996. Immunological responses to antigen B from *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. Parasite Immunol. 18:571–578.

Ito, A., H. Wén, P. S. Craig, L. Ma, M. Nakao, T. Horii, X. L. Pang, M. Okamoto, M. Itoh, Y. Osawa, X. G. Wang, and Y. H. Liu, 1997b. Antibody responses against Em18 and Em16 serodiagnostic markers in alveolar and cystic echinococcosis patients from northwest China. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 50:19–26.

Ito, A., L. Ma, M. Itoh, S. Y. Cho, Y. Kong, S. Y. Kang, T. Horii, X. L. Pang, M. Okamoto, T. Yamashita, M. W. Lightowlers, X. G. Wang, and Y. H. Liu. 1997a. Immunodiagnosis of alveolar echinococcosis by enzyme-linked immunosorbent assay using a partially purified Em18/16 enriched fraction. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:57–59.

Ito, A., L. Ma, P. M. Schantz, B. Gottstein, Y. H. Liu, J. J. Chai, S. K. Abdel-Hafez, N. Altintas, D. D. Joshi, M. W. Lightowlers, and Z. S. Pawlowski, 1999. Differential serodiagnosis for cystic and alveolar echinococcosis using fractions of *Echinococcus granulosus* cyst fluid (antigen B) and *E. multilocularis* protoscolex (Em18). Am. J. Trop. Med. Hyg. 60:188– 192.

Jenkins, D. J., and M. D. Rickard, 1984. Haematological and serological data from dogs raised worm-free and monospecifically infected with helminths. Aust. Vet. J. 61:309–311.

Jenkins, D. J., and M. D. Rickard, 1985. Specific antibody responses to *Taenia hydatigena, Taenia pisiformis* and *Echinococcus granulosus* infection in dogs. Aust. Vet. J. 62:72–78.

Jenkins, D. J., and M. D. Rickard, 1986a. Specific antibody responses in dogs experimentally infected with *Echinococcus granulosus.* Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:345–349.

Jenkins, D. J., and M. D. Rickard, 1986b. Specificity of scolex and oncosphere antigens for the serological diagnosis of taeniid cestode infections in dogs. Aust. Vet. J. 63:40–42.

Jenkins, P., J. B. Dixon, N. K. Rakha, and S. D. Carter, 1990. Regulation of macrophage-mediated larvicidal activity in *Echinococcus granulosus* and *Mesocestoides corti* (Cestoda) infection in mice. Parasitology. 100:309–315.

Jiang, L., H. Wen, and A. Ito, 2001. Immunodiagnostic differentiation of alveolar and cystic echinococcosis using ELISA test with 18-kDa antigen extracted from *Echinococcus* protoscoleces. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 95:285–288.

Jones, W. O., D. L. Emery, S. J. McClure, and B. M. Wagland, 1994. Changes in inflammatory mediators and larval inhibitory activity in intestinal contents and mucus during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis.* Int. J. Parasitol. 24:519–525.

Gentilin, M., M. Denis, D.R. Chard, 1981. Maladie parasitaire pa. 115: 109-122.

Judson, D. G., J. B. Dixon, M. J. Clarkson, and J. Pritchard, 1985. Ovine hydatidosis: some immunological characteristics of the seronegative host. Parasitology 91:349–357.

Kaderi, A., 1991. Hydatidosis Humaine: Characterization antigenique et diagnostic serologique. Faculté Sciences de Marrakech, Maroc.

Kamenetzky, L., P. M.Muzulin, A.M. Gutierrez, S.O. Angel, A. Zaha, E.A. Guarnera, M.C. Rosenzvit, 2005. High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of Echinococcus granulosus. Parasitology 131, 805–815.

Kamiya, M., and H. Sato, 1990. Survival, strobilation and sexual maturation of *Echinococcus multilocularis* in the small intestine of golden hamsters. Parasitology 100:125–130.

Kanan, J.H., B.M. Chain, 2006. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of Echinococcus granulosus. Immunology. 118:271–278.

Kanazawa, T., H. Asahi, H. Hata, K. Mochida, N. Kagei, and M. J. Stadecker,1993. Arginine-dependent generation of reactive nitrogen intermediates is instrumental in the in vitro killing of protoscoleces of *Echinococcus multilocularis* by activated macrophages. Parasite Immunol. 15:619–623.

Kandil, OM., OA. Mahdy, SK. Abou-El-Dobal, 2004. Purification and characterization of three larval Taeniid antigens by gel filtration. Vet .med. Giza ., 52(4):449-456.

Kanwar, J. R., R. K. Kanwar, A. S. Grewal, and V. K. Vinayak, 1994. Significance of detection of immune-complexed 8 kDa hydatid-specific antigen for immunodiagnosis of hydatidosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 9:231–236.

Kanwar, J.R., S.P. KaushYk, I.M.S. Sawhney, M.S. Kamboj, S.K. Mehta and V.K. VYnayak, 1992. Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting, J. Med.Microbiol. 36:46-51.

Kassis, A. I., and C. E. Tanner, 1976. The role of complement in hydatid disease: in vitro studies. Int. J. Parasitol. 6:25–35.

Kassis, A. I., and C. E. Tanner, 1977a. *Echinococcus multilocularis:* complement's role in vivo in hydatid disease. Exp. Parasitol. 43:390–395.

Kassis, A. I., and C. E. Tanner, 1977b. Host serum proteins in *Echinococcus* vol. 16, 2003 immunology and diagnosis of hydatid disease 33 downloaded from cmr.asm.org by on June 6, 2010 *multilocularis:* complement activation via the classical pathway. Immunology 33:1–9.

Khan, A.H., A.A. El-Buni, M.y. Ali, 2001. Fertility of the Cysts of *Echinococcus granulosus* in Domestic Herbivores from Benghazi, Libya, and the reactivity of Antigens produced from them.Ann Trop Med Parasitol. 95(4):337-42.

Kilejian, A., S. Kenneth, and C.W. Schwabe, 1962. Host-parasite relationships in Echinococcosis, VIII. Infrared spectra and chemical composition of the hydatid cyst. Exp. Parasitol. 12: 377-392.

King, C. L., and T. B. Nutman, 1993. IgE and IgG subclass regulation by IL-4 and IFN-gamma in human helminth infections. Assessment by B cell precursor frequencies. J. Immunol. 151:458–465.

King, C. L., C. C. Low, and T. B. Nutman, 1993. IgE production in human helminth infection. Reciprocal interrelationship between IL-4 and IFNgamma. J. Immunol. 150:1873–1880.

Kittelberger R., M P.Reichel, J. Jenner, D D. Heath, M W. Lightowlers, P. Moro, M M. Ibrahem, P S.Craig, J S.O'Keefe, 2002. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies in sheep infected with *Echinococcus granulosus*. Vet. Parasitol. 110: 57–76.

Lahmar, S., M. Kilani, B.R. Torjerson, M.A. Gemmell, 1999. *Echinococcus granulosus* Larvae in the Livers of Sheep in Tunisia: the Effects of host .Ann Trop Med Parasitol. 93 (1): 75-81.

Lauriola, L., M. Piantelli, R. Pozzuoli, E. Arru, and P. Musiani, 1978. *Echinococcus granulosus:* preparation of monosepcific antisera against antigens in sheep hydatid fluid. Zentbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Orig. A. 240:251–257.

Leggatt, G. R., and D. P. McManus, 1994. Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from *Echinococcus granulosus* (hydatid disease) cyst fluid. Parasite Immunol. 16:87–96.

Leggatt, G. R., W. Yang, and D. P. McManus, 1992. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86:189–192.

Lightowlers, M. W., 1990. Cestode infections in animals: immunological diagnosis and vaccination. Rev. Sci. Technol. 9:463–487.

Lightowlers, M. W., A. Flisser, C. G. Gauci, D. D. Heath, O. Jensen, and R. Rolfe, 2000. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. Parasitol. Today 16:191–196.

Lightowlers, M. W., and B. Gottstein, 1995. Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis, p. 355–410. *In* R. C. A. Thompson and A. J. Lymbery (ed.), The biology of *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

Lightowlers, M. W., D. Y. Liu, A. Haralambous, and M. D. Rickard, 1989. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. Mol. Biochem. Parasitol. 37:171–182.

Lightowlers, M. W., M. D. Rickard, and R. D. Honey, 1986. Serum antibody response following parenteral immunization with hydatid cyst fluid in sheep infected with *Echinococcus granulosus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:818–823.

Lightowlers, M. W., M. D. Rickard, R. D. Honey, D. L. Obendorf, and G. F. Mitchell, 1984. Serological diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in sheep using cyst fluid antigen processed by antibody affinity chromatography. Aust. Vet. J. 61:101-108.

Lightowlers, M. W., O. Jensen, E. Fernandez, J. A. Iriarte, D. J. Woollard, C. G. Gauci, D. J. Jenkins, and D. D. Heath, 1999. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. Int. J. Parasitol. 29:531–534.

Lightowlers, M. W., S. B. Lawrence, C. G. Gauci, J. Young, M. J. Ralston, D. Maas, and D. D. Heath, 1996. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. Parasite Immunol. 18:457–462.

Liu, D., M. D. Rickard, and M. W. Lightowlers, 1993. Assessment of monoclonal antibodies to *Echinococcus granulosus* antigen 5 and antigen B for detection of human hydatid circulating antigens. Parasitology. 106:75– 81.

Lloyd, S. 1987. Cysticercosis, vol. II. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Luttermoser, G.W. and M. Koussa, 1963. Epidemiological of Echinococcosis in the Middle East, II. Incidence of hydatid infection in swine in Lebanon and its significance. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 12:22-25.

Ma, L., A. Ito, Y. H. Liu, X. G. Wang, Y. Q. Yao, D. G. Yu, and Y. T. Chen, 1997. Alveolar echinococcosis: Em2plus-ELISA and Em18-western blots for follow-up after treatment with albendazole. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 91:476–478.

MacManus, D. P., N. J. Barret, 1985. Isolation, fractionation and partial characterization of the tegumental surface from protoscoleces of the hydatid organism, Echinococcus granulosus, parasitology. 90:111-129.

Maddison, S.E., S.B. Slemenda, P.M. Schantz, J.A. Fried, M. Wilson, and V. Tsang, 1989. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa, Am.J. Med. Hyg. 40:377-383.

Maizels, R.M., M. Yazdanbakhsh, 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nature Reviews of Immunology 3: 733–744.

Margutti, P., E. Ortona, S. Vaccari, S. Barca, R. Rigano, A. Teggi, F. Muhlschlegel, M. Frosch, and A. Siracusano, 1999. Cloning and expression of a cDNA encoding an elongation factor 1beta/delta protein from *Echinococcus granulosus* with immunogenic activity. Parasite Immunol. 21:485– 492.

Matossian, .R.M., 1990. Laboratory and Field Evaluation of Human Hydatidosis (larval Echinococcus) in Lebanon (an interim report). Helminthologia. 27:203-210.

Matossian, R.M., M.D. Rickard, and J.D. Smyth, 1977. Hydatidosis: A global Problem of increasing importance. Bulletin of the World Health Organization. 55:499-507.

McManus, D. P., and C. Bryant. 1995. Biochemistry, physiology and molecular biology of *Echinococcus*, p. 355–410. *In* R. C. A Thompson and A. J. Lymbery (ed.), The biology of *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

McManus, P., W. Zhang, J. Li, P. B. Bartley, 2003. Echinococcosis. The Lancet; 362(18): 1295-1304.
Meslin, Z.S., Pawlowski, 2002. WHO/ Oie, Manual on *Echinocosis* in human and animals: Public health problem of global concern.
Moro, P., P.M. Schantz, 2008. *Echinococcosis*: a review, International Journal of Infectious diseases, 13:125-133.
Morseth, D.J., 1967. Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of *Echinococcus granulosus*. Journal of parasitology, 53:312-325.
Mosmann, T. R., and S. Sad, 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol. Today. 17:138–146.
Movsesijan, M., A. Sokolic, and Z. Mladenovic. 1968. Studies on the immunological potentiality of irradiated *Echinococcus granulosus* forms: immunization experiments in dogs. Br. Vet. J. 124:425–432.
Movsesijan, M., and Z. Mladenovic. 1970. Active immunisation of dogs against *Echinococcus granulosus*. Vet. Glas. 24:189–193.
Musiani, P., M. Piantelli, L. Lauriola, E. Arru, and R. Pozzuoli, 1978. *Echinococcus granulosus:* specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. J. Clin. Pathol. 31:475–478.
Muzulin, P.M., L. Kamenetzky, A. M.Gutierrez, E.A. Guarnera, M.C.Rosenzvit, 2007. Echinococcus granulosus antigen B gene family: further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. Experimental Parasitology . 3:123-132.
Nandi, J., S.Ramajeyam, 1990. Purification of antigen for serodiagnosis of echinococcosis. Indian. J. Pathol. Microbiol. 33(4):344 –50.
Noble, E.R., and G.N. Noble, 1974. Parasitology,The biology of animal parasite 3th edition,Press LEA and Febiger, Philadelphia.
Oie, 2000. Echinococcosis/ hydatidosis-Manul of diagnostic test and vaccines for terrestrial animal. 285-264.
Oriol, C., and R. Oriol, 1975. Physiocochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24:96–100.
Oriol, R., J. F. Williams, M. V. Perez Esandi, and C. Oriol, 1971. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20:569–574.
Ortona, E., P. Margutti, S.Vaccari, R. Rigano, E. Profumo, B. Buttari, A. Chersi, A. Teggi, A. Siracusano, 2001. Elongation factor 1 beta/ delta of Echinococcus granulosus and allergic manifestations in human cystic echinococcosis. Clinical and Experimental Immunology 125, 110–116.
Ortona, E., P.Margutti, F. Delunardo, S. Vaccari, R. Rigano, E. Profumo, B. Buttari, A. Teggi, A. Siracusano, 2003. Molecular and immunological characterization of the C-terminal region of a new Echinococcus granulosus Heat Shock Protein 70. Parasite Immunology 25: 119–126.
Ortona, E., R. Rigano, P. Margutti, S. Notargiacomo, S. Ioppolo, S. Vaccari, S. Barca, B. Buttari, E. Profumo, A. Teggi, and A. Siracusano, 2000. Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. Parasite Immunol. *22 (11)*:553–559.
Ortona, E., S. Vaccari, P. Margutti, F. Delunardo, R. Rigano, E. Profumo, B. Buttari, O. Rasool, A. Teggi, A. Siracusano, 2002. Immunological characterization of Echinococcus granulosus cyclophilin, an allergen reactive with IgE and IgG4 from

patients with cystic Echinococcosis. Clinical and Experimental Immunology 128: 124–130.

Osborn, P. J., and D. D. Heath, 1982. Immunisation of lambs against *Echinococcus granulosus* using antigens obtained by incubation of oncospheres in vitro. Res. Vet. Sci. 33:132–133.

Pandey, V.S., H. Ouhelli, and A. Moumen, 1988. Epidemiology of Hydatidosis /Echinococcosis in Quarzazate, The pre_Saharian Region. Of Morocco, Ann. T.M. and parasit. 82(5):461-470.

Pauluzzi, S., and F. De Rosa, 1969. L'idatidosi sperimentale. V. Vaccinoprofilassi contro l'idatidosi sperimentale secondaria da *Echinococcus granulosus* del topo BALB/c. Ann. Sclavo 11:518–530.

Pawlowski, I. D., J. Eckert, D. A. Vuitton, R. W. Ammann, P. Kern, P. S. Craig, K. F. Dar, F. De Rosa, C. Filice, B. Gottstein, F. Grimm, C. N. L. MacPherson, N. Sato, T. Todorov, J. Uchino, W. von Sinner, and H. Wen, 2001. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment, p. 20–71. *In* J. Eckert, M. A. Gemmell, F.-X. Meslin, and Z. S. Pawlowski (ed.), WHOI/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: apublic health problem of global concern. World Organisation for Animal Health, Paris, France.

Pearce, E. J., P. Caspar, J. M. Grzych, F. A. Lewis, and A. Sher, 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni.* J. Exp. Med. 173: 159–166.

Pennoit-De Cooman, E., P. H. De Rycke, and E. J. Van Outryve, 1974. Experimental secondary echinococcosis of *Echinococcus granulosus.* V. Quantitative aspects of the infection rate. Tropenmed. Parasitol. 25:338– 344.

Petrova, R. F., 1968. Blood picture in experimental hydatidosis in sheep. Meteriali Seminara-Soveshch. Borbe Gel'mint. Zhivot. Chimk. Alma-Ala p. 115–116.

Piantelli, M., R. Pozzuoli, E. Arru, and P. Musiani, 1977. *Echinococcus granulosus:* identification of subunits of the major antigens. J. Immunol. 119:1382–1386.

Pinon, J. M., J. Poirriez, H. Lepan, R. Geers, R. Penna, and D. Fernandez, 1987. Value of isotypic characterization of antibodies to *Echinococcus granulosus* by enzyme-linked immuno-filtration assay. Eur. J. Clin. Microbiol. 6:291–295.

Pipkin. A.C., E. Rizk, and G.P. Balikian, 1951. Echinococcosis in the Near East and its incidence in animal hosts. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 45:253- 260.

Playford, M. C., and M. Kamiya, 1992. Immune response to *Echinococcus multilocularis* infection in the mouse model: a review. Jpn. J. Vet. Res. 40:113–130.

Poretti, D., E. Felleisen, F. Grimm, M. Pfister, F. Teuscher, C. Zuercher, J. Reichen, and B. Gottstein, 1999. Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60:193–198.

Pozzuoli, R., M. Piantelli, C. Perucci, E. Arru, and P. Musiani, 1975. Isolation of the most immunoreactive antigenes of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. J. Immunol. 115:1459–1463.

Pozzuoli, R., P. Musiani, E. Arru, C. Patrono, and M. Piantelli, 1974. In: Zhang et al. Clin. Microbiol. Rev. Downloaded from cmr.asm.org by on June 6, 2010 *Echinococcus granulosus:* evaluation of purified antigens immunoreactivity. Exp. Parasitol. 35:52–60.

Profumo, E., E. Ortana, R.Rigano, I. Gioia, S. Notargiacomo, S. Loppolo, and A. Siracusano, 1994. Cellular and humoral responses to antigenic subunits of *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients, Parasite Immunol. 16:393-398.

Quilici, M., Y. Assadourian, P. Ranque, 1971. Le diagnostic immunologique de 1 h'ydatidose. éltude de la valeur Compareé de 5 technique sérologique. Med. Trop,(31):207-313.

Rahman, M.S., S.M. Sokkar, S. Dahab, 1992. Comparative studies on hydatidosis in farm animals in Egypt. Dtsch .Tierarzt. Wochenschr. 99(11):438-440 .

Rainbird, M. A., D. Macmillan, and E. N. Meeusen, 1998. Eosinophilmediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. Parasite Immunol. 20:93–103.

Ramtin, H., M. Fatemeh & M. B. Rokni, 2003. Evaluation of a dot-ELISA for the serodiagnosis of human hydatid diseas Pak. J. Med. Sci. 19 (4):268-271.

Ramzy, R. M., H. Helmy, E. A. El Zayyat, M. M. Rifaat, D. M. Abdel Hameed, and M. H. Abdel-Baki. 1999. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgG1 antibodies specific to human cystic echinococcosis in Egypt. Trop. Med. Int. Health 4:616–620.

Ravetch, J.V., S. Bolland, 2001. IgG Fc receptors. Annual Review of Immunology. 19:275–290.

Ravinder, P. T., S. C. Parija, and K. S. Rao, 1997. Evaluation of human hydatid disease before and after surgery and chemotherapy by demonstration of hydatid antigens and antibodies in serum. J. Med. Microbiol. 46: 859–864.

Richards, K. S., C. Arme, and J. F. Bridges, 1983. *Echinococcus granulosus equinus:* an ultrastructural study of murine tissue response to hydatid cysts Parasitology 86:407–417.

Rickard, M. D., and J. F. Williams, 1982. Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. Adv. Parasitol. 21:229–296.

Rickard, M. D., and M. Lightowlers. 1986. Immunodiagnosis of hydatid disease, p. 217–249. *In* R. C. A. Thompson (ed.), The biology of *Echinococcus* and hydatid disease. George Allen and Unwin, London, United Kingdom.

Riffkin, M., H. F. Seow, D. Jackson, L. Brown, and P. Wood, 1996. Defence against the immune barrage: helminth survival strategies. Immunol. Cell Biol. 74:564–574.

Rigano , R., S. Ioppolo, E. Ortona, P. Margutti, E. Profumo, M.D. Ali, B. Di Vico, , A.Teggi, A. Siracusano, 2002. Long-term serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates. Clinical and Experimental Immunology 129, 485–492.

Rigano, R., B. Buttari, E. Profumo, E. Ortona, F. Delunardo, P. Margutti, V. Mattei, A. Teggi, M. Sorice, A. Siracusano, 2007. Echinococcus granulosus antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. Infection and Immunity. 75: 1667–1678.

Rigano, R., Buttari, B., E. De Falco, E.Profumo, E. Ortona, P. Margutti, C. Scotta, A.Teggi, A. Siracusano, 2004. Echinococcus granulosus- specific T-cell lines derived from patients at various clinical stages of cystic echinococcosis. Parasite Immunology 26: 45–52.

Rigano, R., E. Profumo, A. Teggi, and A. Siracusano, 1996. Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with *Echinococcus granulosus* infection. Clin. Exp. Immunol. 105:456–459.

Rigano, R., E. Profumo, and A. Siracusano, 1997. New perspectives in the immunology of *Echinococcus granulosus* infection. Parassitologia 39:275–277.

Rigano, R., E. Profumo, B. Buttari, A. Teggi, and A. Siracusano, 1999. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pharmacologically treated cystic echinococcosis. Clin. Exp. Immunol. 118:95–101.

Rigano, R., E. Profumo, F. Bruschi, G. Carulli, A. Azzara, S. Ioppolo, B. Buttari, E. Ortona, P. Margutti, A. Teggi, and A. Siracusano, 2001. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. Infect. Immun. 69:288–296.

Rigano, R., E. Profumo, G. Di Felice, E. Ortona, A. Teggi, and A. Siracusano, 1995a. In vitro production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from hydatid patients. Clin. Exp. Immunol. 99:433–439.

Rigano, R., E. Profumo, S. Ioppolo, S. Notargiacomo, A. Teggi, and A. Siracusano, 1998. Cytokine patterns in seropositive and seronegative patients with *Echinococcus granulosus* infection. Immunol. Lett. 64:5–8.

Rigano, R., E. Profumo, S. Ioppolo, S. Notargiacomo, E. Ortona, A. Teggi, and A. Siracusano, 1995b. Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease. Clin. Exp. Immunol. 102:281–285.

Riley, E. M., J. B. Dixon, D. F. Kelly, and D. A. Cox, 1985. The immune response to *Echinococcus granulosus:* sequential histological observations of lymphoreticular and connective tissues during early murine infection. J. Comp. Pathol. 95:93–104.

Riley, E. M., J. B. Dixon, P. Jenkins, and G. Ross, 1986. *Echinococcus granulosus* infection in mice: host responses during primary and secondary infection. Parasitology. 92:391–403.

Rogan, M. T., and P. S. Craig, 1997. Immunology of *Echinococcus granulosus* infections. Acta Trop. 67:7–17.

Rogan, M. T., I. Marshall, G. D. Reid, C. N. Macpherson, and P. S. Craig, 1993. The potential of vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) and baboons (*Papio anubis*) as models for the study of the immunology of *Echinococcus granulosus* infections. Parasitology 106:511–517.

Rogan, M. T., P. S. Craig, E. Zehyle, G. Masinde, H. Wen, and P. Zhou, 1992. In vitro killing of taeniid oncospheres, mediated by human sera from hydatid endemic areas. Acta Trop. 51:291–296.

Rogan, M.T., Hai, W.Y., Richardson, R., Zeyhle, E., Craig, P.S., 2006. Hydatid cysts: does every picture tell a story? Trends in Parasitology. 22, 431–438.

Rokni, MB., B. Aminian, 2006. Evaluation of the Enzyme-linked immuno-ElectroTransfer blot (EITB) technique using hydatid cyst antigens b/5 and total IgG antibodies in laboratory diagnosis of human hydatidosis, Pak J Med Sci . 22(2): 127 – 131.

Roneus, O., D. Christensson, and N. G. Nilsson, 1982. The longevity of hydatid cysts in horses. Vet. Parasitol. 11:149–154.

Rosenzvit, M.C., Camicia, F., Kamenetzky, L., Muzulin, P.M., Gutierrez, A.M., 2006. Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from Echinococcus granulosus. Parasitology International 55, S63–S67.

Rott, M. B., V. Fernandez, S. Farias, J. Ceni, H. B. Ferreira, K. L. Haag, and A. Zaha, 2000. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from

Echinococcus granulosus: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. Acta Trop. 75:331–340.

Sabry M.A., 2007. Advanced concepts in diagnosis of Hydatidosis in Human and living Animals, Egypt, Journal of Biological Sciences, 7(5): 720-728.

Sanchez, F., F. March, M. Mercader, P. Coll, C. Munoz, and G. Prats, 1991. Immunochenical localization of major hydatid fluid antigens in protoscolices and cyst of *Echinococcus granulosus* from human origin, Parasite Immunol. 13:583-592.

Sarma et .al (2002) In:Kandil OM., OA. Mahdy, SK. Abou-El-Dobal, 2004. Purification and characterization of three larval Taeniid antigens by gel filtration. Vet .med. Giza., 52(4):449-456.

Schantz, P. M., and B. Gottstein, 1986. Echinococcosis (hydatidosis), vol. 1. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.

Schantz, P.M., D. Shanks and M. Willson, 1980. Serologic cross- reaction with sera from patients with Echinococcosis and Cysticercosis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 29(4):609-612.

Schmitt, M., F.Saucy, S.Wyborn & B.Gottstein, 1997.In: Eckert J., M.A. Gemmell, F.X. Meslin and Z.S. Pawłowski , 2002. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A public health Problem of Global Concern.

Seimenis, A., 2003. Overview of the Epidemiological Situation on Echinococcosis in the Mediterranean Region. Acta Tropica. 85:191-195.

Shambesh, M. K., P. S. Craig, H. Wen, M. T. Rogan, and E. Paolillo, 1997. IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients. Acta Trop. 64:53–63.

Shapiro, S. Z., G. M. Bahr, and P. R. Hira, 1992. Analysis of host components in hydatid cyst fluid and immunoblot diagnosis of human *Echinococcus granulosus* infection. Ann. Trop. Med. Parasitol. 86:503–509.

Shepherd, J. C., A. Aitken, and D. P. McManus, 1991. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. Mol. Biochem. Parasitol. 44:81–90.

Shepherd, J. C., and D. P. McManus, 1987. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. Mol. Biochem. Parasitol. 25:143–154.

Siavashi MR., H. Taherkhani, K. Rezaei, M R R. Deligani and M. Assmar, 2005. Comparison of Dot-ELISA and Sandwich ELISA Diagnostic Tests in Detection of Human Hydatidosis, Iran. Biomed. J. 9 (2): 91-94.

Siles-Lucas, M. M., and B. B. Gottstein, 2001. Molecular tools for the diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis. Trop. Med. Int. Health 6:463–475.

Simseks, S., E. Koroglu, A. E. Utuk, 2006. Application of western blotting and enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)for the diagnosis of *dicrocoelium dendriticum* in sheep using excretory secretory(E/S)antigens. Turk. J. Anm. Sci. 30: 113-119.

Singh, B. P., and D. N. Dhar, 1988. Indirect fluorescent antibody test for the detection of antibodies to *Echinococcus granulosus* in experimentally infected pups. Vet. Parasitol. 28:185–190.

Siracusano .A., R. Rigano, E. Ortona , E. Profumo, P. Margutti , B. Buttari , F. Delunardo, A. Tegg, 2008. Immunomodulatory mechanisms during Echinococcus granulosus infection, Experimental Parasitology. 119 : 483–489.

Siracusano, A., Ortona, E., Rigano, R., 2002. Molecular and cellular tools in human cystic echinococcosis. Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders. 2: 235–245.

Sixl, W., E. Wisidagama, D. Stunzner, H. Withalm, and B. Sixl-Voigt, 1988. Serological examinations of dogs (*Canis familiaris*) in Colombo/Sri Lanka. Geogr. Med. Suppl. 1:89–92.

Skander, F., and D. Larbaoui, 1992. Operative incidence of Hydatidosis in Algeria Between 1986-1988.Medical Journal of Infectious and Parasitic Diseases. 7:257-261.

Slais, J., and M. Vanek, 1980. Tissue reaction to spherical and lobular hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786). Folia Parasitol. 27:135–143.

Smith, B.J., 1994. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Protein. In: Methods in Molecular Biology, Vol.32: Basic protein and peptides protocols, p: 23-34, Humana Press Inc; Totowa ,N.J.

Smyth, J. D., 1977. Strain differences in Echino- granu. With special references to the status of Equine Hydatidosis in the United Kigdom. Transactions of the Roy. Soc. T.M. Hyg. 71:93-100.

Smyth, J. D., and M. M. Smyth, 1964. Natural and experimental hosts of *Echinococcus granulosus* and E.multilocularis with comments on gentics of speciation in Genus Echinococcus. Parasitology. 54:493-514.

Soulsby, E. J. L., 1987. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7th ed. p. 119-127.

Spruance, S. L., 1974. Latent period of 53 years in a case of hydatid cyst disease. Arch. Intern. Med. 134:741–742.

Stankiewicz, M., W. E. Jonas, P. C. Douch, B. Rabel, S. Bisset, and W. Cabaj, 1993. Globule leukocytes in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. J. Parasitol. 79:940–945.

Sterla, S., H. Sato, and A. Nieto, 1999. *Echinococcus granulosus* human infection stimulates low avidity anticarbohydrate IgG2 and high avidity antipeptide IgG4 antibodies. Parasite Immunol. 21:27–34.

Stoyanov, A., D.Dimanov, J. Mitev, and S.Georgiev, 1999. A study on Echinococcosis/Hydatidosis in animals. Bulg. J. Agric. Sci. 5(4):659-662.

Sturm, D., J. Menzel, B. Gottstein, and P. Kern, 1995. Interleukin-5 is the predominant cytokine produced by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis. Infect. Immun. 63:1688–1697.

Swarna S.R., & S. C. Parija, 2008. dot-ELISA for evaluation of *Hydatid* cyst wall, *Protoscoleces* and *Hydatid* cyst fluid antigens in the serodiagnosis of cystic *Echinococcosis. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 50(4):233-236.*

Taherkhani, H., 2001. Analysis of the *Echinococcus granulosus* Laminated Layer Carbohydrates by Lectin Blotting, Iran. Biomed.J. 5(1): 47-51.

Thompson, C. R. A., and D. P. McManus, 2001. Aetiology: parasites and life-cycles, p. 1–19. *In* J. Eckert, M. A. Gemmell, F.-X. Meslin, and Z. S. Pawlowski (ed.), WHOI/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health, Paris, France.

Thompson, R. C., L. M. Kumaratilake, and J. Eckert, 1984. Observations on *Echinococcus granulosus* of cattle origin in Switzerland. Int. J. Parasitol. 14:283–291.

Thompson, R.C.A., 1978. Aspects of speciation in *Echinococcus granulosus*. Veterinary parasitology. 4:121-125.

Thompson, R.C.A., A.J. Lymbery, and C.C. Constantine, 1995. Variation in Echnococcosis: towards a taxonomic revesion of the Genus. Advances in Parasitology. 35:145-176.

Thornton, H., and G.Gracy, 1974. Text book of meat hygiene. 6th Eidition Bailliere ,Tendall and Cassell. London. 331-340.

Toncheva, V., P. Zhelyaskov, 1999. Prevalence of the Hydatid Echinococcosis in Plodive district. Bulg.J. Agric. Soi. 5(3):525-528.

Torres Rodriguez, J. M., and C. Wisnivesky, 1978. Kinetics of the serological response in the experimental primary hydatid disease of mice infected with *Echinococcus granulosus* embryophores. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 53:479–486.

Touil-Boukoffa, C., B. Bauvois, J. Sanceau, B. Hamrioui, and J. Wietzerbin, 1998. Production of nitric oxide (NO) in human hydatidosis: relationship between nitrite production and interferon-gamma levels. Biochimie. 80:739–744.

Touil-Boukoffa, C., J. Sanceau, B. Tayebi, and J. Wietzerbin, 1997. Relationship among circulating interferon, tumor necrosis factor-alpha, and vol. 16, 2003 Immunology and diagnosis of hydatid disease, downloaded from cmr.asm.org by on June 6, 2010 interleukin-6 and serologic reaction against parasitic antigen in human hydatidosis. J. Interferon Cytokine Res. 17:211–217.

Turner, E. L., D. A. Berberian, and E. W. Dennis, 1933. Successful artificial immunization of dogs against *Taenia echinococcus.* Proc. Soc. Exp. Biol.Med. 30:618–619.

Turner, E. L., D. A. Berberian, and E. W. Dennis, 1936. The production of artificial immunity in dogs against *Echinococcus granulosus.* J. Parasitol. 22:14–28.

Turner, E. L., E. W. Dennis, and D. A. Berberian, 1937. The production of artificial immunity against hydatid disease in sheep. J. Parasitol. 23:43–61.

Van Snick, J., 1990. Interleukin-6: an overview. Annu. Rev. Immunol. 8:253–278.

Varela-Diaz, V.M., E.A. Coltorti, A. D'Alessandro, 1978. immunoelectrophoresis test showing *Echinococcus granulosus* arc 5 in human cases of *Echinococcus vogeli* and cysticercosis multiple myeloma. American Journal of Tropical Medicine Hygeine. 27: 554-557.

Vercelli, D., L. De Monte, S. Monticelli, C. Di Bartolo, A. Agresti, 1998. To E or not to E? International Archives of Allergy and Immunology. 116: 1–4.

Virginio, V.G., L. Taroco, A. L.Ramos, A.M. Ferreira, A. Zaha, H.B. Ferreira, A. Herna´ndez, 2007. Effects of protoscoleces and AgB from Echinococcus granulosus on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. Parasitology Research. 100:935–942.

Von sinner, w.n., 1991. New diagnosis signs in Hydatid disease Radiography, Ultrasound. CT and MRI correlated to pathology, European Journal of Radiology. 12:150-159.

Wellinghausen, N., P. Gebert, and P. Kern, 1999. Interleukin (IL)-4, IL-10 and IL-12 profile in serum of patients with alveolar echinococcosis. Acta Trop. 73:165–174.

Wen, H., and P. S. Craig, 1994. Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51:741– 748.

WHO, 2006. The control of neglected zoonotic , Report of a Joint WHO/DFID-AHP Meeting with the participation of FAO and OIE Geneva, 20 and 21 September 2005.

Williams, J. F., M. V. Perez Esandi, and R. Oriol, 1971. Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in the immunodiagnosis of human infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20:575–579.

Woollard, D. J., C. G. Gauci, D. D. Heath, and M. W. Lightowlers, 1998. Epitope specificities and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine. Parasite Immunol. 20:535–540.

Woollard, D. J., D. D. Heath, and M. W. Lightowlers, 2000. Assessment of protective immune responses against hydatid disease in sheep by immunization with synthetic peptide antigens. Parasitology. 121:145–153.

Yong, W. K., and D. D. Heath, 1979. 'Arc 5' antibodies in sera of sheep infected with *Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena* and *Taenia ovis.* Parasite Immunol. 1:27–38.

Yong, W. K., D. D. Heath, and F. Van Knapen, 1984. Comparison of cestode antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* infections in sheep. Res. Vet. Sci. 36:24–31.

Zarzosa, M.P., A.Orduna Domingo, P.Guttierez, P.Alonso, M.Cuervo, A.Prado, M.A.Bratos, M.Garcia-Yuste, G.Ramos, A.Rodriguez, A. Torros, 1999. Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 35 (4): 255-262.*

Zhang, L. H., and D. P. McManus, 1996, Purification and N-terminal amino acid sequencing of *Echinococcus granulosus* antigen 5. Parasite Immunol. 18:597–606.

Zhang, L. H., D. D. Joshi, and D. P. McManus, 2000. Three genotypes of *Echinococcus granulosus* identified in Nepal using mitochondrial DNA markers. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94:258–260.

Zhang, W. B., and D. Z. Zhao, 1992. A comparison of calcification of hydatid cysts in sheep pastured and post-fed. Chin. J. Vet. Sci. Technol. 22:28–29.

Zhang, W. B., Z. Z. Zhang, and P. S. Chi, 1999. Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus* using soluble antigens of protoscoleces. Chin. J. Vet. Sci. Technol. 29:21–22.

Zhang, W. B., Z. Z. Zhang, H. Alili, and P.S. Chi, 1994. An investigation of factors influencing the hyperendemic of echinococcosis in Xinjiang. Chin. J.Zoonoses 10:204–205.

Zhang, W., D.P. McManus, 2006. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. FEMS Immunology and Medical Microbiology 47: 24–41.

Zhang, W., H. You, Z. Zhang, G. Turson, A. Hasyet, and D. P. McManus, 2001. Further studies on an intermediate host murine model showing that a primary *Echinococcus granulosus* infection is protective against subsequent oncospheral challenge. Parasitol. Int. 50:279–283.

Zhang, W., J. Li, D.P. McManus, 2003. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. Clinical Microbiology Reviews 16, 18–36.